

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/53, 9/02	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/21326 (43) Date de publication internationale: 28 octobre 1993 (28.10.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00367 (22) Date de dépôt international: 13 avril 1993 (13.04.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/04491 13 avril 1992 (13.04.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ORSAN [FR/FR]; 16, rue Ballu, F-75009 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : KAZMAIER, Michael [DE/FR]; 5, rue Sophie-Germain, F-75014 Paris (FR). LACROUTE, François [FR/FR]; 61, allée de la Pièce-du-Lavoir, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). MIGNOTTE-VIEUX, Claudia [FR/FR]; 16, rue de la Trompette, F-17000 La Rochelle (FR). MINET, Michèle [FR/FR]; 18, rue des Genêts, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). POMPON, Denis [FR/FR]; 9, place du Marché-Neuf, Chevreuil, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR).	(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	
(54) Title: METHOD OF CLONING A DNA SEQUENCE CODING FOR A PLANT NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE AND ASSOCIATED DNA SEQUENCES (54) Titre: PROCÉDE DE CLONAGE D'UNE SÉQUENCE D'ADN CODANT POUR UNE NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE DE PLANTES ET SÉQUENCES D'ADN CORRESPONDANTES (57) Abstract <p>Method of coding a DNA sequence coding for an NADPH-cytochrome P450 reductase of an organism, especially a plant. The process is characterized in that (1) a strain of yeast transformed with plasmids from a total cDNA bank of the organism, especially a plant, and having a deficiency phenotype of endogenous NADPH-cytochrome P450 reductase activity, is subjected to treatment with a P450 cytochrome inhibitor at a dose which makes lethal the absence of endogenous NADPH-cytochrome P450 reductase activity; (2) the surviving clones are collected and plasmids for the expression of an NADPH-cytochrome P450 reductase activity corresponding to the NADPH-cytochrome P450 of said organism, especially of said plant, are extracted.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet un procédé de clonage d'une séquence d'ADN codant pour une NADPH-Cytochrome P450 Réductase d'un organisme, notamment de plantes, caractérisé en ce que: 1) on soumet une souche de levure transformée avec des plasmides d'une banque d'ADNc total dudit organisme, notamment de ladite plante, et ayant un phénotype de déficience en activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène, à un traitement avec un inhibiteur de cytochrome P450 à une dose qui rend létale l'absence d'activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène, puis 2) on récupère les clones survivants et on en extrait les plasmides permettant l'expression d'une activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase qui correspond à la NADPH-Cytochrome P450 dudit organisme, notamment de ladite plante. La présente invention a également pour objet des séquences d'ADN codant pour une NADPH-Cytochrome P450 Réductase, notamment de plantes.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PROCEDE DE CLONAGE D'UNE SEQUENCE D'ADN CODANT POUR UNE
NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE ET SEQUENCES D'ADN
CODANT POUR UNE NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE, NOTAM-
MENT DE PLANTES

5

La présente invention concerne un procédé de clonage d'un
gène de NADPH Cytochrome P450 Réductase de plante ou d'un autre
organisme par un crible basé sur une complémentation fonctionnelle dans
une souche de levure où la NADPH cytochrome P450 Réductase endogène
est soit déficiente, soit rendue de niveau modulable.

10

La présente invention concerne plus particulièrement
l'application de ce procédé au clonage de gènes de NADPH Cytochrome
P450 Réductases de plantes.

15

La présente invention concerne en outre l'utilisation de
l'ADNc d'une NADPH Cytochrome P450 Réductase de plante obtenu par
ledit procédé, pour cloner des gènes de NADPH Cytochrome P450
Réductases d'une autre plante par hybridation sous condition de stringence
réduite.

20

La présente invention concerne également des séquences
d'ADN codant pour une NADPH Cytochrome P450 Réductase de plante
obtenues par les procédés de clonage selon l'invention.

Domaine technique de l'invention

25

Les NADPH Cytochrome P450 Réductases (ci-après abrégées
"P450Réd") sont indispensables à l'activité enzymatique des Cytochromes
P450 (ci-après abrégés "P450") (1). Dans le complexe membranaire
fonctionnel P450-P450 Réd, elles apportent au P450 des électrons à un
potentiel électrochimique suffisamment négatif pour leur permettre
d'effectuer les réactions de type monooxygénasique. Ces réactions sont
caractérisées le plus souvent par l'introduction d'un atome d'oxygène dans
des liaisons carbone-carbone ou carbone-hydrogène ou alors par l'oxydation
d'un hétéroatome (2). Jusqu'à présent, les P450 Réd étaient considérées
comme uniques dans une espèce donnée où elles interagissaient avec
l'ensemble des P450 présents. La présente invention démontre le caractère
erroné de ce concept et que différentes classes de Réductase peuvent
contrôler l'activité de différentes familles de P450.

35

Bien que l'état des connaissances concernant l'intervention de P450 de plantes dans les différentes voies de biosynthèse ou de détoxification ne soit pas aussi avancé que dans le domaine des P450 de mammifères, l'implication de P450 dans de nombreuses réactions du métabolisme secondaire de différentes plantes, est décrite aujourd'hui dans la littérature (3). Il est également connu par la littérature que les P450 de plantes interviennent dans la métabolisation de certains pesticides tels que le diclofop ou le chlortoluron (4, 5). L'activité des P450 Réductases comme donneur électronique indispensable à la fonction des P450 est susceptible d'être utilisée dans une grande gamme de domaines d'applications. On peut citer à titre d'exemples non-limitatifs :

- la bioconversion d'arômes ou de pigments naturels à partir de précurseurs endogènes à la plante. En effet, il a été démontré qu'un certain nombre de molécules de natures chimiques très variées comme les phénylpropanoïdes, les terpenoïdes, les acides gras et les stérols sont substrats de P450 de Plante (3). Ces molécules sont également des intermédiaires de la biosynthèse de molécules d'intérêt industriel tels que les arômes, pigments ou des phytoalexines (substances de défense synthétisées par la plante contre des infections pathogènes). Dans ce but, l'isolement des gènes de P450 de plantes et de P450 Réductases associées, leur clonage et leur surexpressions coordonnées dans un microorganisme adapté afin d'y reconstruire une portion de voie de biosynthèse est d'un intérêt certain. On peut citer comme applications :

- Le remplacement des étapes d'hydroxylation stéréospécifique lors de la synthèse chimique de molécules d'intérêt industriel par voie biotechnologique. L'introduction de groupements hydroxyle à des positions bien précises par la voie de la chimie de synthèse est souvent fastidieuse et coûteuse. Cette étape peut être avantageusement remplacée par l'utilisation d'un complexe P450/P450 Réductase capable de faire des réactions d'hydroxylation à la position voulue. A titre d'exemple, on peut citer la conversion de la digitoxine en digoxine par une hydroxylation en position 12 beta (6). L'enzyme qui effectue cette réaction dans des cellules en culture de Digitalis lanata est une hydroxylase à cytochrome P450 ;

- La modulation in vivo de voies de biosynthèse de plantes. La découverte de l'existence d'au moins deux P450 Réductases à fonction non-interchangeable est une forte indication qu'au moins les deux P450 Réductases isolées pourraient intervenir différemment dans les voies

de biosynthèse chez la Plante. La modulation dans des plantes transgéniques de l'activité relative des P450 Réductases pourrait être un moyen puissant de contrôle global de fonction telle que la floraison, la croissance, la symbiose, la résistance au parasite, la fructification, la conservation et le mûrissement des fruits, etc... ;

- Un diagnostic in vitro de pollution de l'environnement. Un certain nombre de polluants industriels sont soit des inhibiteurs ou des activateurs de P450 de plantes ;

- L'oxydation de xénobiotiques. Il a été démontré que certains P450 constituent des facteurs de résistance et de sélectivité vis-à-vis des pesticides. Il est clairement intéressant de transférer ces gènes vers des plantes d'intérêt agronomique de façon à les rendre résistantes à un herbicide, fongicide, insecticide, etc... La disponibilité des Réductases correspondantes dans la même localisation que les P450 impliqués est un facteur critique pour cette utilisation.

Etat de la technique

Bien que les P450 et les P450 Réductases aient été mis en évidence chez les plantes au début des années 1970 (7), des clones génomiques ou d'ADNc de P450 Réductases membranaires proviennent d'eucaryotes supérieurs (homme, lapin, porc, rat ou truite), ou de levures, à l'exclusion du règne végétal. La faible teneur en P450 Réductase des tissus végétaux, ainsi que le mauvais rendement des procédés de purification décrits, s'est soldé par un sérieux retard dans le développement d'outils de clonage chez les plantes.

La recherche de l'activité enzymatique des P450 Réductases nécessite la reconstitution d'un complexe multienzymatique membranaire, un procédé très mal maîtrisé jusqu'à présent dans le cas des enzymes de plantes. Récemment, la purification à homogénéité d'une protéine P450 Réd de la patate douce (8) et du topinambour (9) a été décrite. Leur identité a été démontrée par la reconstitution d'un très faible niveau d'activité P450 à partir de préparations partiellement purifiées de P450 de plante. Un anticorps polyclonal dirigé contre la P450 Réd de Topinambour inhibe complètement l'hydroxylation du cinnamate par la cinnamate 4-hydroxylase (P450) dans les microsomes de topinambour (9).

Cette réaction est commune dans le règne végétal puisque l'acide cinnamique est le tronc commun de différentes voies de biosynthèse conduisant à la lignine, à de nombreux pigments végétaux, à des composés de défense et à des arômes. Le même anticorps anti-P450 Réd inhibe des réactions P450 dépendantes dans un grand nombre d'espèces végétales, par contre il ne montre pas de cross-réactivité avec les P450 Réd de levure, d'insectes, de poissons ou de mammifères (10). Inversement des anticorps contre les P450 Réd de levure ou de mammifères n'inhibent pas les P450 Réd végétales.

Des études plus poussées ont montré que la P450 Réd de topinambour (et de plusieurs autres espèces) ne semble pas une forme unique sur la base d'expériences d'immunoblotting et de chromatographie d'affinité (présence de trois bandes de poids moléculaire de 80, 82 et 84 kDa) (11). Néanmoins ces travaux ne permettaient pas de conclure en l'existence de plusieurs gènes dans la mesure où il avait été démontré dans au moins un des cas qu'une des bandes correspondait à une glycoprotéine. De ce fait, il n'était pas connu si les différentes bandes correspondaient à différents états de modification post-traductionnels d'une même protéine ou à des protéines de séquences distinctes. Des fragments de digestion de la forme de 80 kDa ont été microséquencés, et les séquences peptidiques obtenues ont pu être alignées avec les séquences connues de truite, lapin, rat, porc, et levure. Sur une distance allant de 10 à 15 aminoacides, l'homologie trouvée dans le meilleur des cas est de l'ordre de 60%. Très récemment, un anticorps monoclonal fabriqué à partir d'un mélange des trois formes de P450 Réd de Topinambour, dans l'espoir qu'il sera capable de reconnaître un motif structural commun entre les trois isoformes, s'est avéré reconnaître uniquement une structure dite "dinucléotide fold", un motif banal présent dans un très grand nombre d'enzymes NAD(P)H dépendantes (12).

Les approches classiques pour cloner un gène de Réductase de plantes soit par criblage de banques avec un anticorps spécifique, soit par hybridation avec des sondes hétérologues ou déduites des séquences en acides aminés obtenues par microséquençage de Réductases de plantes, se sont révélées inefficaces pour les raisons suivantes :

- le niveau d'expression de la P450 Réd au niveau ARNm de plantes est très faible, comparé aux taux d'expression mesuré chez les mammifères. L'induction chez la plante par une blessure ou autres moyens, est modeste

et de surcroît un phénomène transitoire. Même dans des conditions optimales d'induction, la P450 R_{éd} reste donc une protéine mineure dans les tissus végétaux (12). Le criblage d'un ADNc peu abondant dans une banque d'ARNm total de plante est une procédure fastidieuse et lente. Il faut ajouter aussi que, d'une manière générale, il est plus difficile d'obtenir une banque d'ARNm de bonne qualité chez les plantes qu'à partir de tissus de mammifère.

- Aucune séquence d'acide nucléique de P450 R_{éd} végétale n'était connue, le criblage par hybridation devait être effectué soit avec une sonde de mammifère ou de levure, soit avec des oligonucléotides dérivés des microséquences d'acides aminés de la P450 R_{éd} de topinambour. Dans les deux cas, l'utilisation de conditions de stringence faible était requise, ce qui augmentait de façon considérable la possibilité d'obtenir des faux positifs. S'il existe dans la littérature un certain nombre d'exemples qui ont décrit l'application avec succès d'anticorps spécifiques pour le criblage de banques d'expression, la réussite de cette procédure, qui dépend entièrement de la spécificité de l'anticorps, est quelque peu aléatoire.

Résumé de l'invention

La présente invention fournit un procédé de clonage de gènes de toutes NADPH-Cytochrome P450 Réductases indépendamment de leurs provenances, procédé qui consiste à se servir d'un crible permettant de déceler l'activité même d'un Cytochrome P450.

Par rapport aux méthodes classiques de clonage citées ci-dessus, qui se basent sur des critères indépendants de la fonction, comme le degré d'homologie ou la reconnaissance de motifs structuraux, le procédé de clonage selon la présente invention comporte un degré considérablement supérieur de fiabilité puisque basé sur la fonction.

L'absence d'activité NADPH-cytochrome P450 Réductase endogène n'est pas létale chez la levure si l'activité cytochrome P450 est exprimée.

En particulier, chez la levure, et plus particulièrement Saccharomyces cerevisiae, un P450, la lanostérol 14-déméthylase (C14DM), constitue une étape essentielle de la biosynthèse de l'ergostérol, un

constituant majeur de la membrane cellulaire. L'absence de l'activité C14DM résulte en l'accumulation d'intermédiaires méthylés en 14 de la biosynthèse de l'ergostérol dans la membrane et en un défaut en ergostérol, ce qui est léthal pour la cellule (14). La délétion de la P450 Réd, par contre, n'est curieusement pas léthal alors que celle de la C14DM l'est. En effet, une Réductase inconnue microsomale NADH dépendante (sur la base de son activité à reconstituer une activité Ethoxyrésorufine-O-dééthylase en présence de cytochrome P450 1A1 de souris et de NADH), peut alternativement fournir des équivalents réducteurs à la C14DM de façon à assurer le taux de synthèse d'ergostérol requis pour que la cellule puisse survivre.

Soumise à de fortes doses d'inhibiteurs de cytochrome P450, la levure ne survit pas. Toutefois, une souche de levure qui n'exprime plus l'activité P450 Réductase ne survit pas à des doses d'inhibiteur de P450 tel que le kétoconazole, normalement insuffisantes pour être léthales, c'est-à-dire insuffisantes pour être léthales lorsque l'activité P450 Réd est exprimée (13).

Le procédé selon l'invention se base sur la découverte que ce phénotype d'hypersensibilité à un inhibiteur de P450, notamment à l'antifongique kétoconazole d'une souche de levure déficiente en activité P450 Réductase endogène est supprimé par l'expression d'une P450 Réductase exogène (quel que soit le donneur d'électrons).

La présente invention a en effet pour objet un procédé de clonage d'une séquence d'ADN codant pour une NADPH-Cytochrome P450 Réductase, notamment de plantes, ou d'un autre organisme, caractérisé en ce qu'on réalise les étapes suivantes :

- 1- On soumet une souche de levure transformée avec des plasmides d'une banque d'ADNc total dudit organisme, notamment de ladite plante, et ayant un phénotype de déficience en activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène, à un traitement avec un inhibiteur de cytochrome P450 à une dose qui rend léthale l'absence d'activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène, puis

2- On récupère les clones survivants et on en extrait les plasmides permettant l'expression d'une activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase qui correspond à la NADPH-Cytochrome P450 dudit organisme, notamment de ladite plante.

5 On entend donc par l'expression "dose qui rend létale" une dose qui -normalement, c'est-à-dire lorsque l'activité P450 Réd endogène est exprimée- n'est pas létale pour la levure et ne le devient qu'en l'absence d'activité P450 Réd endogène. La dose d'inhibiteur de P450 ne doit donc pas dépasser la dose létale, même en présence de P450
10 Réductase endogène.

La transformation de l'Etape 1 se fait selon des techniques bien connues de l'homme de l'art ; par exemple, à partir d'une souche de levure Ura- et des plasmides portant le gène URA 3 comme marqueur de sélection, ce qui permet d'exercer une pression de sélection en l'absence
15 d'uracile.

Dans la présente invention, on peut se servir de levures totalement ou partiellement déficientes en P450 Réductase endogène pour tester une activité P450 Réd.

L'obtention et la description des souches de S. cerevisiae, dans
20 lesquelles le gène de la NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène a été soit délété, soit mis sous le contrôle d'un promoteur inductible permettant de l'activer, sont décrits dans la demande de brevet n° FR 2679249 (n° 91 08884) publiée le 22 janvier 1993) (souches PES1-3D et PES1-3U). Dans la souche PES1-3U, le gène endogène de la NADPH-
25 Cytochrome P450 Réductase a été mis sous le contrôle du promoteur GAL10-CYC1, ce qui confère à la souche un phénotype sauvage en milieu galactose. Dans la souche PES1-3D, la région codante de la NADPH-Cytochrome P450 Réductase a été remplacée par le gène du marqueur TRP1, ce qui lui confère un phénotype déficient permanent en NADPH-
30 -Cytochrome P450 Réductase.

On entend par "inhibiteur de Cytochrome P450" un composé qui interagit avec ledit Cytochrome P450 notamment par complexation, de sorte que ledit Cytochrome P450 se trouve inactivé.

Un grand nombre de composés azole, et plus particulièrement
35 le kétoconazole, ont été développés comme fongicides puissants dans le domaine médical et agricole et peuvent être utilisés selon l'invention (15).

La dose létale est variable selon les agents et selon la souche, en général une dose de 5 à 100 µg/ml, de préférence de 10 à 50 µg/ml, peut être suffisante dans le procédé selon l'invention.

Les agents antifongiques du type kétoconazole inhibent en particulier la déméthylation du lanostérol au niveau de la C14DM en formant un complexe 1:1 avec ce P450. Du fait de l'affinité très élevée du kétoconazole, le lanostérol en tant que substrat physiologique ne peut pas déplacer l'inhibiteur, ce qui entraîne la mort de la cellule. Une souche sauvage de levure est résistante jusqu'à une concentration de 50 voire 80 µg/ml de kétoconazole. L'observation selon la présente invention qu'une souche déficiente en P450 Réd est plus sensible au kétoconazole jusqu'à 10 fois, et peut-être létal à 5 µg/ml (à cause du mauvais couplage entre la P450 Réd non-spécifique et la C14DM), a été utilisée pour développer un mode de sélection de l'activité NADPH P450 Réd. En effet, après transformation d'une souche de levure déficiente en NADPH P450 Réd avec une banque d'ADN exogène, ne pourront pousser en présence de 50 µg/ml de kétoconazole que des cellules transformées dans lesquelles l'ADN exogène reçu a introduit une activité P450 Réd suffisante. Le point essentiel de cette méthode de criblage par complémentation fonctionnelle est son universalité, puisqu'on peut tenir compte des différences d'efficacité de couplage entre la C14DM de levure et la P450 Réd exogène en variant la concentration d'inhibiteur.

Dans un mode de réalisation, on a appliqué le procédé selon la présente invention au clonage des P450 Réd végétales, en particulier de l'espèce Arabidopsis thaliana. En l'absence de connaissances quant aux conditions maximales d'induction de l'expression de la P450 Réd chez Arabidopsis et des tissus où la P450 Réd est exprimée, l'ARNm total extrait à partir de jeunes plantules entières en phase de croissance nécessite une intense activité de synthèse, on peut donc supposer que tous les facteurs nécessaires à la croissance de la plantule soient exprimés à ce stade-là. L'utilisation de plantules entières dilue la population d'ARNm exprimés de façon tissu-spécifique dans la population totale d'ARNm, mais présente l'énorme avantage de ne pas tenir compte de conditions particulières d'induction de la P450 Réd, et de faciliter la préparation du matériel de départ.

Une banque d'expression chez S. cerevisiae peut être construite de façon connue par insertion d'un ADNc double brin dans un vecteur entre un promoteur et un terminateur de transcription de levure. On peut utiliser le promoteur bien connu de type PGK (16), étant bien
5 entendu que la nature du promoteur n'est pas critique pour la méthode selon l'invention. De préférence, toutefois, on utilisera un promoteur fort dans la levure. La nature multicopie du vecteur utilisé, bien que souhaitable, n'est pas non plus critique.

La banque ainsi obtenue est fractionnée avant transformation
10 dans la levure selon la taille des ADNc synthétisés. Comme la taille de la séquence codante de P 450 Réd d'eucaryote décrites dans la littérature est de l'ordre de 2 kbp hormis les séquences 5' et 3' flanquantes, l'ARNm codant pour une P450 Réd chez une plante et en particulier chez Arabidopsis doit raisonnablement être présent dans la fraction ayant un
15 poids moléculaire plus grand que 2 kbp.

Selon l'invention, à l'Etape 1, la banque d'ADNc est e
préférence enrichie en gène d'intérêt (gène de NADPH-Cytochrome P450 Réductase de ladite plante ou autre organisme) par fractionnement selon la
taille, en ne conservant que les fragments de taille supérieure à 2 kbp. Un
20 tel fractionnement conduit en effet à un enrichissement de la banque pour le gène d'intérêt.

Avantageusement selon l'invention, on utilise une méthode de transformation dite "en vol" d'une souche de levure portant un gène rendu
artificiellement conditionnel pour la P450 Réductase endogène. En effet, la
25 déficiencia en P450 Réductase induit une perte de transformabilité importante qui rendrait difficile, voire impossible dans certains cas, la constitution de banque représentative dans une souche délétée pour la P450 Réductase de manière non conditionnelle, c'est-à-dire permanente.

De préférence donc, on utilise une souche de levure dans
30 laquelle le gène de NADPH-Cytochrome P450 Réductase est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible telle que la souche PES1-3U. Dans ce cas, à l'Etape 1, on induit une déficiencia en P450 Réductase en inactivant ledit promoteur dans la souche déjà transformée.

La présente invention a donc également pour objet un procédé
35 caractérisé en ce que le gène de la NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène de levure est mis sous le contrôle d'un promoteur inductible et à l'étape 1, on réalise successivement les sous-étapes suivantes :

1-a) On transforme une souche de levure avec des plasmides d'une banque d'ADNc total dudit organisme, notamment de ladite plante, puis

5 1-b) On induit la déficience en activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène en inactivant ledit promoteur, et

1-c) On soumet ladite souche à un traitement avec ladite dose d'inhibiteur de cytochrome P450.

Dans un mode de réalisation, la souche PES1-3U est, dans un premier temps, transformée par une banque d'ADNc dudit organisme, notamment de la plante et les transformants sélectionnés uniquement sur la base du marqueur de sélection URA3 du plasmide. Dans un second temps, les transformants sont soumis à l'inhibiteur de P450, notamment au kétocozazole, pour rendre létale l'absence d'activité NADPH Cytochrome P450 Réductase. Les clones survivants contiennent alors un plasmide permettant l'expression d'une activité P450 Réductase exogène (0,1% environ dans le cas d'Arabidopsis).

La présence d'artefacts de clonage est possible par la sélection d'un facteur de régulation du promoteur inductible tel que GAL 10-CYC1 en milieu glucosé. C'est pourquoi une série d'étapes de contrôle annexes permet de s'assurer, notamment après extraction du plasmide et retransformation d'une souche de levure totalement déficiente en P450 Réductase, que la complémentation est bien due à l'expression d'une NADPH Cytochrome P450 Réductase exogène. Pour ce faire, on utilise une souche de levure dans laquelle le gène de P450 Réductase endogène est entièrement délété, tel que PES 1-3D. L'origine végétale de cette réductase peut être alors contrôlée par hybridation du clone avec l'ADN génomique de la plante d'origine. La nature biochimique du gène cloné est alors vérifiée par séquence.

La présente invention a donc également pour objet un procédé caractérisé en ce qu'après la transformation "en vol" et à l'aide des plasmides récupérés à l'étape 2), on transforme une souche de levure dans laquelle le gène de la NADPH cytochrome P450 Réductase endogène a été délété et on réitère un traitement avec un inhibiteur de cytochrome P450 à

une dose qui rend létale l'absence d'activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène, puis on récupère les clones survivants et on en extrait les plasmides permettant l'expression d'une activité NADPH-cytochrome P450 Réductase qui correspond à la NADPH-cytochrome Réductase, notamment de ladite plante.

La présente invention apporte en outre la démonstration de l'existence, dans certains organismes, de plusieurs gènes indépendants de NADPH-cytochrome P450 Réductase codant pour des protéines de caractères physicochimiques prévisibles bien distincts susceptibles d'interagir avec des classes différentes de cytochromes P450.

Le procédé selon l'invention a permis de cloner deux séquences d'ADN codant pour des NADPH-Cytochrome P450 Réductase d'*Arabidopsis* ara-B et ara-C telles que représentées aux Figures 9 et 10 respectivement.

La présente invention a donc également pour objet des séquences d'ADNc codant pour des NADPH-Cytochrome P450 Réductase d'*Arabidopsis* ara-B ou ara-C, ou de topinambour *Heliantus tuberosus*, telles que représentées aux Figures 9 à 11 respectivement.

En effet, selon la présente invention, une séquence codante entière d'*Arabidopsis* (ara-C), y compris les séquences 5' et 3' flanquantes, a ensuite été utilisée comme sonde pour cribler une banque d'ADNc totale de topinambour *Heliantus tuberosus* sous conditions de stringence réduite. Cette banque a été obtenue à partir de nodules de topinambour qui ont été induits pour la synthèse de la P450 Réd par blessure, mais n'a pas été enrichie par fractionnement selon la taille des ADNc. L'usage d'un anticorps monospécifique dirigé contre un mélange des trois isoformes présentes chez le topinambour ne s'est pas avéré fructueux; ni le criblage à l'aide de sonde hétérologue (Réductase de levure et humaine), ou dérivées de la séquence protéique, n'avaient permis le clonage. Le criblage de la même banque avec une sonde d'ADNc du clone ara-C a mis immédiatement en évidence des positifs ayant un insert de plus de 2 kbp avec une fréquence de 1 pour 10.000 après trois tours de criblage.

Ainsi, par le procédé de la présente invention, on a pour la première fois isolé et identifié trois ADNc de source végétale codant pour des NADPH-Cytochrome P450 Réductases dans deux espèces différentes

(Arabidopsis et topinambour Helianthus tuberosus). Les microsomes préparés à partir de ces souches transformées par les vecteurs d'expression de levure sont capables de réduire un substrat non-physiologique des P450 Réd, le Cytochrome c. L'alignement des séquences en acides aminés avec les séquences connues de P450 Réd provenant d'autres sources eukaryotes permet de les identifier comme étant des P450 Réd d'Arabidopsis sur la base d'une très forte conservation au niveau des domaines fonctionnels des P450 Réd décrits dans la littérature. Une comparaison directe au niveau acides aminés entre les deux P450 Réd d'Arabidopsis montre des longs blocs d'homologie quasi parfaite pour les mêmes domaines tandis que, en dehors de ces domaines notamment, la distribution des acides aminés chargés varie significativement. En southern génomique avec de l'ADN d'Arabidopsis digéré par différents enzymes de restriction, les deux clones d'ADNc s'hybrident à des loci génomiques différents indiquant clairement la présence de deux gènes. Une analyse plus fine des séquences montre que (Figure 8) :

- la divergence en acide-aminés entre les deux Réductases d'Arabidopsis (ara-B et ara-C) est de 36%, alors que celle entre les gènes de la Réductase ara-B et topi-A est de 31% et celle entre ara-C et topi-A est de 27%. Ceci est une forte indication que les deux gènes chez Arabidopsis ont évolué indépendamment durant un temps au moins comparable à celui de la divergence entre ces espèces végétales lointaines.

Par ailleurs, l'analyse de la conservation en nucléotides sur la troisième base des codons (Figure 8) après alignement entre les séquences en aminoacides des Réductases, démontre un très faible résidu de conservation évolutive confirmant les données précédentes. Cette très faible conservation au niveau nucléotidique, sur les bases non contraintes comparées à l'homologie relativement élevée des Réductases de plantes entre elles au niveau amino-acides, démontre l'existence d'une forte contrainte évolutive sur la fonction des deux gènes d'Arabidopsis. Ceci indique que l'activité de ces deux gènes est évolutivement critique pour la plante et suggère que ces deux gènes ne sont pas interchangeables. Ils semblent donc jouer des rôles individuels dans la vie de la plante probable du fait de leurs association à des voies de biosynthèse spécifiques.

Outre des séquences d'ADNc codant pour une NADPH P450 Réductase de plante obtenue par les procédés de clonage selon l'invention, la présente invention a également pour objet des séquences d'ADN s'hybridant dans des conditions faiblement stringentes à 50°C et/ou
5 présentant au moins 60% d'homologie avec l'une des séquences d'Arabidopsis ou de topinambour Helianthus tuberosus représentées aux Figures 9 à 11, ou tout autre séquence de NADPH-Cytochrome P450 Réductase, notamment de plantes, obtenue par les procédés de clonage selon l'invention.

10 Bien évidemment, la présente invention a également pour objet toutes séquences d'ADN équivalentes, c'est-à-dire qui diffèrent des séquences d'ADNc ci-dessus mentionnées, seulement par une ou plusieurs mutation(s) neutre(s), c'est-à-dire dont le changement ou la substitution des nucléotides en cause, n'affectent pas la séquence primaire de la protéine
15 résultante.

Enfin la présente invention a également pour objet la protéine NADPH-Cytochrome Réductase de plante obtenue par l'expression dans la levure d'un gène de NADPH-Cytochrome P450 Réductase constitué par une séquence d'ADN selon l'invention.

20 Les systèmes d'expression utilisables pour l'expression des gènes de NADPH-Cytochrome P450 Réductase de plantes dans la levure comprennent notamment des promoteurs constitutifs de gènes de levure et leurs terminateurs parmi lesquels on peut citer les promoteurs PGK (Phosphoglycérate Kinase), CYC 1 (Isocytochrome c1), ADH (alcool
25 déhydrogénase), G6PDH (glucose-6-phosphate déhydrogénase).

L'utilisation des promoteurs inductibles est particulièrement avantageuse en raison de la séparation des phases de production de la biomasse et de la protéine d'intérêt. L'activité enzymatique de la protéine hétérologue peut entraîner une forte consommation de cofacteurs
30 diminuant ainsi le pool de cofacteurs nécessaires au cycle cellulaire.

Les systèmes d'expression peuvent être introduits sur un plasmide non réplcatif comprenant des éléments permettant la recombinaison et l'intégration chromosomique.

Enfin, la présente invention a également pour objet des
35 protéines NADPH-Cytochrome P450 Réductase de plante recombinante, obtenues à partir des séquences d'ADN codant pour des NADPH-Cytochrome P450 Réductase de plante obtenues selon l'invention.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée du mode de réalisation suivant.

5 La Figure 1 est une représentation schématique des éléments constitutifs du vecteur pFL 61, des sites uniques de restriction et leur localisation physique ainsi que la cassette de clonage insérée dans le site Not I à la position 1254.

10 La Figure 2 représente la séquence nucléotidique de la région d'insertion de la cassette de clonage dans le site Not I du vecteur pFL 61 avec les sites de restriction. Les deux sites Not I en bordure de la cassette et les deux sites BstX I portés par la cassette sont indiqués par les flèches.

La Figure 3 est une représentation schématique du principe de clonage utilisant des adaptateurs synthétiques aux bouts non compatibles.

15 La Figure 4 représente le schéma d'obtention d'une souche mutante de levure où le promoteur endogène du la P450 Réd est remplacé par le promoteur modulable GAL10-CYCI après recombinaison homologue avec un fragment linéaire Eco RI du vecteur pGP1PC.

20 La Figure 5 représente le schéma d'obtention d'une souche mutante de levure où le gène du marqueur TRP1 a été introduit au locus endogène de la P450 Réd pour donner la souche PES 1-3D.

La Figure 6 représente la classification des clones pouvant conférer un phénotype kétoconazole^R à la souche PES 1-3U après transformation selon leur profil de restriction et la fréquence d'apparition.

25 La Figure 7 représente la mesure de l'activité NADPH CYT P450 Réductase dans des microsomes isolés de la souche mutante PES 1-3D (WRD) après transformation avec de l'ADN plasmidique provenant des classes A, B, C, E. Comme contrôles ont été inclus la souche PES 1-3D (WRD) non-transformée (absence d'activité de P450 Réd) et la souche sauvage W303.1B (activité endogène de P450 Réd).

30 La Figure 8 représente l'homologie entre NADPH-P450 Réductase végétale et comparaison à des P450 Réductases connues, humaines et de levure. La ligne 1 montre le calcul du taux global de conservation au niveau acides aminés entre les deux P450 Réd d'Arabidopsis, les lignes 2 à 4 montrent le taux de conservation entre des

35

séquences d'acides aminés des deux P450 Réd d'*Arabidopsis* avec la P450 Réd humaine (HRed) et la P450 Réd de levure (YRed) connues de la littérature. La ligne 5 montre la distance évolutive entre la P450 Réd de levure et la P450 Réd humaine. Les lignes 6 et 7 montrent le taux de conservation entre les deux P450 Réd d'*Arabidopsis* et une P450 Réd d'une autre espèce végétale, isolé par cross-hybridation avec AraC comme sonde.

Les Figures 9 à 11 représentent les séquences nucléotidiques et les séquences déduites des acides aminés des deux ADNc de P450 Réd d'*Arabidopsis* (Ara B -Figure 9- et Ara C -Figure 10-) isolées par complémentation fonctionnelle et de la P450 Réd de topinambour (Figure 11) isolée par crosshybridation (TopA).

La Figure 12 représente l'alignement des séquences en acides aminés déduites des ADNc des trois P450 Réd végétales. Les positions de conservation stricte entre les réductases végétales sont indiquées par des astérisques en ligne 4. La cystéine conservée parmi toutes les P450 réductases végétales et animales connues et qui est importante pour la fixation du NADPH est marquée par un astérisque. Les domaines fonctionnels de ces réductases ont été déduits par comparaison avec les P450 Réd connues et sont indiqués par les blocs A1, A2, B1, B2 et C. Les séquences nécessaires à la fixation du FMN sont indiquées par les blocs A1 et A2.

Les séquences nécessaires à la fixation du FAD sont représentées par les blocs B1 et B2. Les séquences nécessaires pour la fixation du NADPH sont représentées par le bloc C. La ligne 1 correspond à AraB, la ligne 2 à AraC et la ligne 3 à TopA.

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* PES1-3U a été déposée auprès de la Collection Nationale des Cultures et de Microorganismes le 17 mars 1992, sous le numéro de dépôt I-1187.

1) Construction du vecteur d'expression chez *S. cerevisiae*

Le vecteur pFL61, utilisé ici pour le clonage d'une banque d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana*, a été obtenu à partir du vecteur pFL60, décrit dans la littérature (17). Il est caractérisé par les modifications suivantes : A la place du polylinker ClaI-BglII présent dans pFL60, a été

créé un site unique Not I (figure 1 et 2). Dans ce site unique a été introduit ensuite une cassette contenant à l'intérieur deux sites uniques BstXI et bordée de bouts 5' sortants compatibles Not I. La digestion avec BstXI génère un vecteur linéarisé avec deux bouts incompatibles (18). La recirculation du vecteur ne sera possible qu'en présence d'un fragment d'ADN possédant des bouts compatibles avec ceux créés sur le vecteur par la digestion BstXI (figure 3). La cassette d'insertion est placée entre le promoteur inductible PGK et le terminateur PGK, ce qui permettra l'expression des séquences d'ADN hétérologue insérées. De plus, ce vecteur contient le gène marqueur d'auxotrophie URA3 de *S. cer.*, une petite partie du plasmide 2u comprenant l'origine de replication de *S. cer.* et des séquences provenant du vecteur d'*E. coli* pUC19 qui sont inchangées par rapport au vecteur d'origine pFL 60.

2) Préparation d'une banque totale d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* triée selon le poids moléculaire des ADNc.

De jeunes plantules entières, comprenant feuilles, tiges et racines, sont collectées au stade deux feuilles, congelées dans de l'azote liquide puis broyées dans un mortier contenant du milieu d'homogénéisation congelé (10 mM Tris-HCl pH8,0, 1 mM EDTA pH8, 0,5% sodium Dodecyl Sulfate). La poudre ainsi obtenue est ensuite décongelée et extraite deux fois avec un volume égal d'un mélange 1:1 Phénol/chloroforme. Après addition de 1/10 volume d'une solution 4M NaCl, la solution aqueuse est de nouveau extraite deux fois avec un mélange 1:1 phénol/chloroforme, et les acides nucléiques sont précipités par l'addition de deux volumes d'éthanol. Les acides nucléiques totaux obtenus sont immédiatement enrichis en ARN poly(A+) par chromatographie sur oligo dT sépharose (19). Après élution et précipitation, les ARN poly(A+) sont resuspendus dans de l'eau, leur quantité est déterminée par absorption à 260 nm, puis ils sont congelés immédiatement jusqu'à utilisation. Une banque d'ADNc totale est synthétisée à partir d'un aliquot de 5ug ARN poly(A+), en utilisant le "cDNA Synthesis System Plus" fourni par Amersham. Les ADNc sont ensuite rendus bout francs avant ligation avec des adaptateurs possédant des bouts 5' sortants CACA qui sont compatibles avec les bouts GTGT produits sur le vecteur de clonage par la digestion avec BstX I (voir Figure 2). Les ADNc

sont ensuite préparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose "low gelling temperature" (Sigma, Cat. N°. A 9539), ce qui enlève aussi l'excès d'adaptateurs gênants lors de la ligation. Lors de l'élution du gel d'agarose, les ADNc sont répartis en deux classes selon leur taille : une
5 allant de 0,2 à environ 2 kb, et une représentant les ADNc plus grands que 2 kb. Après quantification, la ligation a été effectuée en présence de quantités stoechiométriques de vecteur pFL61 digéré par Bst XI (après avoir enlevé le petit fragment Bst XI interne) et d'ADNc de taille supérieure à 2kb. Après transformation par électroporation dans E. coli (Souche MR 32),
10 $2,0 \times 10^5$ clones ont été obtenus. L'ensemble des clones a été réuni pour une préparation d'ADN plasmidique sur gradient chlorure de césium, après avoir enlevé un aliquot en vue d'amplifications futures.

15 **3) Description des souches mutantes de levure utilisées et conditions de culture.**

Les souches décrites ci-dessous ont été décrites dans la demande de brevet en France n° 91 08884 (publié sous le n° 2 679 249). Elles ont été construites à partir d'une souche qui porte le nom W303.1B. Cette souche est haploïde (mating type alpha) et porte comme mutations
20 connues Ura3, Ade 2, His 1, Trp 1, Leu 2 ; elle respire normalement et est capable d'utiliser le galactose comme source de carbone.

On reprend ici la construction des souches PES 1-3U et PES 1-3D.

Souche PES 1-3U

25 Cette souche haploïde (mating type alpha) est totalement isogénique à la souche W303.1B, sauf la région promotrice précédant la phase codante de la P450 Réd endogène, qui est modifiée par recombinaison homologue de façon à remplacer le promoteur naturel de la P450 Réd par le promoteur inductible GAL10-CYCI. La procédure utilisée pour
30 obtenir cette souche recombinante est schématisée dans la Figure 4.

a) La souche W303.1B est transformée (en utilisant la méthode standard au chlorure de lithium) avec un mélange de quatre fragments linéaires d'ADN obtenus après digestion exhaustive du vecteur pGPI-PC par Eco RI. Le seul fragment susceptible d'entrer en recombinaison avec les
35 séquences naturellement présentes dans la souche, porte outre les bornes de recombinaison -la région 5' non codante de la P450 Réd et la région 5'

codant de la P450 R_{éd}- le gène marqueur Ura3 lié au promoteur GAL10-CYC1. Dans un premier temps ont été sélectionnés les recombinants Ura⁺, pour tester l'intégration du marqueur dans le génome de la levure.

5 b) Le deuxième crible consiste en la sélection des transformants Ura⁺ obtenus selon leur vitesse de croissance lente par rapport à W303 1.B en milieu complet glucosé et une croissance identique à W303 1.B en milieu complet galactosé. En effet, un niveau très faible de P450 R_{éd}-qui est sous contrôle du promoteur GAL10-CYC1 après recombinaison-conduit à l'accumulation d'intermédiaires de synthèse de l'ergostérol dans
10 la membrane cellulaire, ce qui a pour conséquence un abaissement considérable de la vitesse de croissance de la cellule. A l'inverse, une expression à haut niveau de la P450 R_{éd} en milieu complet galactosé assurera une biosynthèse correcte de l'ergostérol, et devra présenter les mêmes caractéristiques de croissance que la souche sauvage. Un des clones
15 répondant à ces critères a été choisi et stocké sous le nom de PES 1-3.

c) Un révertant spontané du phénotype Ura⁺ en Ura⁻ a été sélectionné par une réplique faite sur un milieu contenant de l'uracile et de l'acide 5-fluoro-orotique. Un mutant stable Ura⁻ (taux de réversion inférieur à 10⁻⁷), indistinguishable par tout autre critère de PES 1-3, est
20 stocké sous le nom de PES 1-3U.

d) Les caractéristiques relatives au phénotype recombinant du locus de la P450 R_{éd} sont ensuite testés :

- i) vérification du phénotype Ura⁻ de la souche PES1-3U
- 25 ii) amplification par PCR d'une bande de 2,2 kb en utilisant un premier primer situé à l'extrémité 3' du promoteur GAL10-CYC1 et un second primer situé à l'extrémité 5' du brin non-codant de la phase codante.
- iii) test du phénotype kétoconazole^R en milieu complet galactosé, lié à la surexpression de la P450 R_{éd}, par rapport au phénotype kétoconazole^S en milieu complet glucosé.
30

L'article de gène 125 (1993) 49-45 de Truand et al décrit la souche PES1-3U qui est nommée W(R).

La souche PES 1-3D

35 Cette souche est totalement isogénique à la souche PES1-2 décrite dans la demande FR 91 08884, à l'exception du locus sexuel qui a été changé en mating type a par la technique du plasmide HO selon la

méthode publiée (Methods in Enzymology, vol 194, pp 132-146, et du locus de la P450 Réd. L'ensemble de la phase codante ainsi qu'une partie des séquences 5' et 3' flanquantes sont éliminés et le gène du marqueur TRP1 est introduit au niveau de la délétion. Une représentation schématique du locus recombiné de la P450 Réd endogène est donnée en Figure 4.

Conditions de Culture

Les différentes souches sont cultivées à 28°C sous une agitation modérée (agitateur rotatif à 100rpm) dans un milieu semi-synthétique, composé comme suit :

- milieu SWA6 : D-glucose 20 g/l (w/v), Yeast nitrogen base (Difco) 0,7% (w/v), Hydrolysate acide de caséine 0,1% (w/v), adénine 40 mg/l, tryptophane 20 mg/l.
- milieu SWA5 : D-Galactose 20 g/l (w/v), yeast nitrogen base (Difco) 0,7% (w/v), Hydrolysate acide de caséine 0,1% (w/v), adénine 40 mg/l, tryptophane 20 mg/l.

4) Transformation "en vol" de la souche recombinante PES 1-3U

Une condition nécessaire lors de la conception du clonage par complémentation fonctionnelle est l'obtention d'un nombre suffisamment grand de transformants dans la levure de façon à y trouver statistiquement un représentant d'ADNc rares de la banque préalablement enrichie selon la taille des ADNc. Or, le taux de P450 Réd endogène présent dans la levure sauvage semble être strictement lié à la bonne transformabilité de cette levure. La surexpression de la P450 Réd endogène (culture de PES 1-3U en milieu galactose) ainsi que des niveaux très faibles ou l'absence de P450 Réd (culture PES 1-3U en milieu glucose ou PES 1-3D en milieu glucose/galactose) baissent de façon considérable la transformabilité de ces souches mutantes. On décrit ici un protocole qui résout les problèmes de transformation liés à la concentration en P450 Réd : Après une culture de nuit (2×10^7 cellules/ml de la souche PES 1-3U) en milieu galactose permettant la surexpression de la P450 Réd, les cellules sont collectées par centrifugation, lavées et 10^6 cellules/ml sont replacées en milieu glucose où l'expression du gène de la P450 Réd endogène sous contrôle du

promoteur GAL10-CYCI est réprimée. La culture est ensuite continuée pendant 5 h (environ 10^7 cellules/ml), le temps nécessaire pour que le taux initial en P450 Réd retombe à un niveau résiduel correspondant à celui de la souche sauvage. A ce moment, les cellules sont collectées par centrifugation, lavées et utilisées pour la transformation selon la méthode standard chlorure de lithium, décrite dans la littérature.

Après transformation, les cellules sont maintenues en milieu glucosé, ce qui fait tomber à zéro le taux de P450 Réductase endogène présent dans les cellules au moment de la transformation. Ensuite, on procède à la complémentation fonctionnelle ci-après décrite.

5) Complémentation fonctionnelle dans les souches PES 1-3U et PES 1-3D

Après transformation de la souche PES 1-3U avec 10 ug de la banque d'ADNc dans le vecteur pFL61 selon la procédure décrite ci-dessus, les cellules sont étalées sur 20 boîtes ne contenant pas d'uracile, pour sélectionner dans un premier temps pour la présence d'ADN plasmidique dans les levures transformées, le gène URA3 présent sur le vecteur de clonage permettant de compléter le phénotype Ura^- de la cellule récipiente. Environ 2×10^4 transformants initiaux sont ainsi obtenus, répartis en deux pools et ensuite étalés en deux séries indépendantes en double sélection sur des boîtes ne contenant pas d'uracile et comprenant 0, 5, 10, 20 ou 50 ug/ml de kétoconazole pour tester la présence d'une activité P450 Réd dans les transformants initiaux. 52 clones de transformants indépendants secondaires, pouvant compléter le phénotype Ura^- et pouvant pousser en présence de 10 ou 20 ug/ml de kétoconazole ont été isolés et resélectionnés sur milieu SWA-6/kétoconazole 10 ug/ml. 24 clones ont été choisis au hasard pour des minipréparations d'ADN plasmidique selon des méthodes standard, qui sont ensuite utilisées pour transformer une souche d'*E. coli* (DH5-1). Les clones résistants à l'ampicilline (gène bla porté par le vecteur pFL61) ont été sélectionnés et leur ADN plasmidique analysé par double digestion Bam HI/Hind III après amplification. Selon leur profil de restriction (représentation schématique en Figure 6), les 24 clones ont été répartis en 5 classes différentes. La taille des inserts a été

estimée être comprise entre 2 et 3kb, ce qui correspond à la taille attendue après le pré-fractionnement.

Afin d'étudier le caractère héréditaire du phénotype conféré par l'ADN végétal transformé, 4 membres de chaque classe établie sur la base du profil de restriction ont été choisis au hasard pour la transformation de la souche PES1-3D, dans laquelle le gène de la P450 R_{éd} a été disrupté. Après transformation de 10 ug d'ADN plasmidique provenant des quatre membres différents des classes A, B, C, D et E dans la souche PES1-3D, les cellules sont étalées sur une série de 4 boîtes SWA6/agarose contenant 0, 20, 40 ou 80 ug/ml de kétoconazole. Les transformants issus des classes A, B, C et E ont montré une résistance au kétoconazole jusqu'à 40 ug/ml, un niveau comparable à celui de la souche PES1-3 cultivée en milieu SW A5 (réductase endogène exprimée). Les transformants issus de la classe D ont été incapables de pousser en présence de kétoconazole et ont été abandonnés.

6) Dosage enzymatique de l'activité P450 R_{éd} dans la fraction microsomale provenant des 4 classes de transformants de PES 1-3D résistants au kétoconazole

Les cultures (250 ml) de PES1-3U, transformées par les classes A, B, C et E sont arrêtées lorsque la densité cellulaire est de 5×10^7 cellules/ml. Après centrifugation 5 min à 2500 g, le culot cellulaire est suspendu dans 35 ml de tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 100 mM KCl, 20 mM bêta-mercaptoéthanol, incubé à 20°C pendant 10 min, puis recentrifugé à 10000 g pendant 3 min. Après lavage dans 35 ml de tampon de casse (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,6 M Sorbitol), le culot est resuspendu dans un volume de tampon de casse égal à celui du culot, puis sont ajoutées des billes de verre (Braun, diamètre 0,45-0,5 mm) en une quantité juste suffisante pour affleurer la surface de la suspension cellulaire. Les tubes sont fermés hermétiquement et secoués violemment sur agitateur horizontal à une vitesse de 3 coups par seconde durant le temps nécessaire pour que plus de 70% des cellules soient cassées. 3 ml de tampon de casse sont alors ajoutés au mélange, les tubes sont vortexés brièvement puis le liquide présent entre les billes est transféré dans un autre tube. L'extraction est répétée deux fois avec 3 ml de tampon de

casse, et les surnageants sont transférés dans le même tube. L'ensemble des extraits est centrifugé 15 min à 10000 g. Le surnageant est transféré dans un autre tube et le volume est ajusté à 10 ml avec du tampon de casse. Trois cents microlitres d'une solution de NaCl 4M sont ajoutés, puis 3,5 ml
5 d'une solution à 40% (w/v) polyéthylène glycol-4000. Après incubation de 15 min à 0°C et centrifugation à 10 min à 10000 g, le surnageant est soigneusement écarté sans perturber le culot (qui contient les microsomes), puis on rince tube et culot avec un faible volume de tampon de reprise (50 mM Tris-HCl pH 7,4 1 mM EDTA, 20% glycérol) afin d'éliminer les traces de
10 polyéthylène glycol. Le culot ainsi obtenu est resuspendu et homogénéisé dans 1 ml de tampon de reprise, puis la suspension est aliquotée par 200 μ l pour conservation à -80°C.

L'activité de la P450 R_{éd} contenue dans la fraction
microsomale est mesurée par une cinétique de réduction d'un substrat
15 non-physiologique, le cytochrome c de coeur de cheval (Sigma type VI). Le mélange réactionnel contient dans 1 ml de volume final : 2 à 10 μ l d'une solution diluée 30 fois de microsomes, 10 μ M cytochrome c, 100 μ g/ml NADPH dissous dans 50 mM Tris-HCl pH7,4, 1mM EDTA. L'activité est calculée en utilisant un coefficient différentiel de 21 mM⁻¹ à 550 nm. Une
20 unité d'activité P450 R_{éd} est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la réduction de 1 nmole de cytochrome c/min à 20°C. L'activité est rapportée à la quantité totale de protéines microsomales présents dans la réaction qui a été préalablement déterminée par le test BCA de PIERCE.

25 Les activités obtenues sont montrées dans la Figure 7 : tous les clones obtenus par complémentation fonctionnelle expriment une activité de type P450 R_{éd} au moins 3 fois supérieure au bruit de fond mesuré dans la souche déficiente en P450 R_{éd}, transformée avec un vecteur vide. Le clone B ayant montré le même phénotype de résistance au
30 kétoconazole que les clones A, C et E, il faut en conclure qu'environ un tiers de l'activité P450 R_{éd} mesuré dans la souche sauvage est suffisant pour établir ce phénotype dans la souche déficiente après transformation.

7) Détermination de la séquence nucléotidique des inserts d'ADNc dans le vecteur pFL61 isolés à partir des 4 classes de transformants de PES 1-3D résistants au kétoconazole.

Un clone de chaque classe (A, B, C, E), qui auparavant était résistent au kétoconazole et montrait aussi une activité significative de P450 Réd, a été choisi au hasard et l'ADN plasmidique a été préparé à partir d'une miniculture par des méthodes standard. Les fragments correspondant aux ADNc végétaux insérés ont été purifiés par élution de gel d'agarose après digestion du vecteur avec Not I. Les fragments ainsi obtenus sont ensuite sous-clonés dans le vecteur pUC19/NotI, linéarisé par Not I. Ce vecteur est dérivé du vecteur standard pUC19 et caractérisé par les modifications suivantes : Un site Not I unique est créé par la ligation de linkers NotI au vecteur pUC19 linéarisé en HincII dans le polylinker, suivi de la recirculation. Le vecteur ainsi obtenu est ensuite linéarisé en EcoRI, les bouts 5' sortants sont rendus francs par la Klenow polymérase, puis ensuite religés, ce qui rétablit la phase ouverte dans le gène LacZ. Ainsi ce vecteur permet un double criblage après transformation dans une cellule hôte : les colonies blanches poussant sur un milieu complémenté Ampicilline X-Gal et IPTG contiennent le vecteur (le gène de la résistance à l'ampicilline est porté par le plasmide) dont la phase ouverte du gène LacZ a été détruite par l'insertion d'un fragment d'ADN au niveau du polylinker (p. ex. site NotI). Après transformation, les transformants obtenus pour chaque classe sont testés sur la présence d'ADNc inséré par restriction enzymatique, puis sont ensuite utilisés pour le séquençage.

La séquence nucléotidique de l'insert entier d'un représentant de chaque classe (A, B, C, E) a été déterminé par séquençage sur ADN double-brin selon une méthode de Sanger modifiée en utilisant la T7 polymérase fournie par BRL, exactement dans les conditions décrites par le fournisseur. Partant des primers universels situés en 5' et 3' du site d'insertion sur les deux brins du vecteur, la séquence complète a été obtenue par progression graduelle en utilisant des oligonucléotides séquence-spécifiques, dérivés de la partie 5' des séquences nouvellement lues sur les deux brins. La région codante des clones A, C et E étant identique, le séquençage de l'insert complet a été poursuivi avec les clones B et C. La séquence nucléotidique comprenant les régions 5' et 3'

flanquantes et la région codante entière à partir du premier ATG suivi de la phase de lecture ouverte pour les clones B et C est donnée dans les Figures 9 et 10. La numérotation des acides nucléiques est donnée dans la colonne de droite, la numérotation des acides aminés est indiquée en dessous des acides aminés. Concernant les séquences décrites dans les Figures 9 et 10, plusieurs remarques peuvent être faites :

a) Malgré une homologie relativement faible de l'ordre de 36% avec des séquences de P450 Réd connues de levure (21) ou de l'homme (22) au niveau acides aminés déduits, l'identification des séquences d'ADNc isolées sur des critères de fonctionnalité comme étant P450 Réd a été aidée par l'existence de blocs de forte conservation dans tous les domaines fonctionnels auparavant décrits pour les eukaryotes supérieurs à l'exception des plantes.

Ces domaines ont été identifiés sur la base de comparaison des séquences de P450 Réd connues avec celles d'autres flavoprotéines ainsi que sur la base de modifications chimiques des P450 Réd.

(24) Haniu, M., Iyanagi, T., Legesse, K., et Shively, J.E. 1984 J. Biol. Chem. 259, pp 13703-13711

(25) Porter, T.D., et Kasper, C.B. 1986 Biochemistry 25, pp 1682-1687

(26) Porter, C.D. et Kasper, C.B. 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, pp 973-977

(27) Katagiri, M., Murakami, H., Yabusaki, Y., Sugiyama, T., Okamoto, M., Yanano, T. et Ohkawa, H. 1986, J. Biochemistry 100, pp 945-954

(28) Vogel, F. et Lumper, L. 1986, Biochem. J. 236, pp 871-878

Les localisations des sites de fixation du FMN (A1/A2) du FAD (B1/B2) et du NADPH (C) pour les P450 Réd végétales sont obtenus par comparaison à l'alignement selon Yabusaki et al, 1988 (21) et sont indiqués par crochets dans la Figure 12.

b) Les séquences en acides aminés déduits des clones AraB et AraC ne montrent que 64% de conservation stricte entre elles-mêmes bien qu'ayant été criblées sur une fonction identique et provenant du même organisme. De plus, les deux ADNc clonés montrent un pattern d'hybridation différent dans un southern génomique, suggérant qu'elles sont des

produits de transcription de deux gènes bien distincts, présents en copie simple à des endroits différents dans le génôme d'Arabidopsis. Ceci est une indication très forte que les deux ADNc proviennent de gènes indépendants, et qu'il existe une pression sélective pour le maintien de deux protéines à fonction identique. Cette observation est renforcée par la différence de la troisième base du codon sur les acides aminés identiques (Figure 8) : le choix de la troisième base est très proche de la distribution au hasard et largement inférieur au cas de gènes qui ont divergé il y a 300 millions d'années (Figure 8, lignes 8 et 9).

c) Du côté N-terminal, le clone C contient une extension significative de 25 acides aminés (soit 75 nucléotides), comprenant notamment un bloc de 7 sérines qui suit immédiatement le premier ATG.

d) En utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle pour le calcul de l'index d'hydropathie, on peut déceler dans les deux séquences AraB et AraC, un segment très hydrophobe dans la région NH₂- terminale des deux protéines, composé d'une suite d'au moins vingt acides aminés hydrophobes. Ceci est un signal typique d'une protéine localisée dans le réticulum endoplasmique et a également été décrit dans tous les P450 connus à ce jour.

e) En utilisant le programme ISOELECTRIC fourni par Wisconsin GCG Software Package, la charge nette calculée des protéines putatives AraB et AraC déduits des séquences nucléotidiques, montre une différence très nette à pH physiologique (7,5) : AraB est très proche de la P450 Réd humaine en termes de charge nette, AraC étant beaucoup plus acide. Ceci est une forte indication pour une interaction des deux P450 Réd d'Arabidopsis avec des classes de P450 distinctes et/ou une localisation subcellulaire différente, qui explique bien la pression sélective sur la maintenance des deux P450 Réd chez Arabidopsis.

8) Utilisation des ADNc de P450 Réd d'Arabidopsis pour le clonage d'autres P450 Réd végétales par cross-hybridation inter-espèces.

Tenant compte du faible degré de conservation entre les P450 Réd eucaryotes connues (levure, rat, lapin, porc, truite, homme), il est aisément compréhensible que toutes les tentatives d'utiliser des sondes de P450 Réd connues pour isoler une P450 Réd par crosshybridation étaient

vouées à l'échec. Les premières ADNc de P450 Réd végétale ont été utilisées pour le criblage d'une banque d'ADNc de topinambour sous conditions de stringence réduite pour tenir compte des variations inter-espèces.

5 Des morceaux de nodules de topinambour qui ont été maintenus dans de l'eau à 4°C pendant 24h pour induire la synthèse d'ARNm de P450 Réd (12), ont servi comme matériel végétal pour préparer de l'ARNm total de topinambour selon des procédures standard. Une banque d'ADNc total de topinambour dans le phage lambda gt 10 a été obtenue
10 selon la méthode d'OKAYAMA et BERK (13). Environ 20 000 pfu sont ensemencés par boîte petri contenant du milieu LB solide et ensuite transférés sur filtre nitrocellulose (Schleicher and Schuell, BA85). 400 000 pfu de la banque d'ADNc de topinambour sont criblés avec 500 ng d'ADNc purifié AraC, marqué à haute spécificité par random priming, selon les
15 méthodes standard, mais à 50°C au lieu de 65°C pour tenir compte des divergences dans la séquence pour une protéine identique dans différentes espèces végétales. Les filtres sont ensuite lavés dans les conditions de stringence croissante jusqu'à disparition du signal d'hybridation non-spécifique.

20 Plus précisément, les conditions d'hybridation permettant de détecter des séquences d'ADNc codant pour une protéine identique dans différentes espèces végétales sont les suivantes : Un lot de 10 filtres nitrocellulose est préhybridé à 50°C dans un four à hybridation dans une boîte tupperware fermée hermétiquement contenant 100 ml de solution de
25 préhybridation sur un agitateur rotatif. La solution de préhybridation qui a été préalablement maintenue à 50°C contient par 100 ml : 10 ml 50x Denhardt's, 25 ml 20x SSPE, 5 ml 10% Sarcosyl, 0,5 ml ADN de sperme de saumon à 10 mg/ml dénaturé, 59,5 ml eau. La composition des ingrédients est tout à fait standard et décrite dans des livres de référence (24). La
30 durée de préhybridation est de 2 heures minimum. La solution de préhybridation est ensuite éliminée et remplacée par le même volume de solution d'hybridation également préchauffée à 50°C. Cette solution est identique à la solution de préhybridation à l'exception de l'ADN de sperme de saumon qui a été remplacée par 2,5 ug de sonde spécifique marquée
35 radioactivement par random priming, puis dénaturée par chauffage juste

avant de l'ajouter à la solution d'hybridation. La durée d'hybridation est de 16 heures à 50°C sous agitation, puis on procède aux lavages : Le tampon d'hybridation est éliminé et remplacé par 200 ml d'une solution de lavage contenant 1xSSPE, 0,1% SDS, 0,2% pyrophosphate et on laisse agiter à 5 température ambiante pendant 20 minutes. On élimine cette solution, on la remplace par 200 ml de la même solution préchauffée à 50°C et on laisse agiter à 50°C pendant 20 minutes. Cette dernière étape est répétée au moins une fois, puis on égoutte les filtres, on enlève le liquide restant sur des feuilles de papier Whatman puis on scelle les filtres humides mais pas 10 sèches dans un sac en plastique pour exposition.

Les colonies qui avaient hybridé spécifiquement avec la sonde AraC, ont été mis en évidence par exposition en présence d'un écran "Chronex Lightening Plus" (Dupont), puis sont soumis à 2 tours supplémentaires d'hybridation. Les clones positifs après 3 tours d'hybridation ont 15 été utilisés pour des minipréparations d'ADN et identifiés par analyse du profil de restriction. Des fragments de restriction choisis ont été purifiés par électrophorèse agarose LMT (low melting temperature), puis ligés dans le bactériophage M13mp18. L'ADN phagique simple brin a été isolé à partir de cultures de bactéries infectées, par précipitation au polyéthylène glycol, 20 digestion à la protéinase K, extraction phénolique puis précipitation à l'éthanol. La séquence nucléotidique de l'ADN simple brin a été déterminée par la méthode de Sanger (20) en utilisant la T7 polymérase fournie par BRL dans les conditions indiquées par le fournisseur. Partant du primer universel, la séquence complète a été obtenue par progression graduelle en 25 utilisant des oligonucléotides séquence-spécifiques, dérivés de la partie 5' des séquences nouvellement lues sur les deux brins. La séquence d'un clone choisi au hasard qui a été positif après 3 tours d'hybridation avec une sonde de P450 Réd d'Arabidopsis dans les conditions décrites ci-dessus, est montrée en Figure 11. Plusieurs commentaires peuvent être faits :

30 a) Bien que le clone séquencé ne soit pas complet dans l'extrémité NH2 terminale de la protéine, l'ADNc de topinambour isolé par cross-hybridation avec un ADNc de P450 Réd d'Arabidopsis est irrévocablement identifié comme étant celui d'une P450 Réd de topinambour, puisqu'il présente respectivement 69 et 73% d'homologie au niveau des

acides aminés avec les 2 P450 Réd végétales identifiées auparavant, AraB et AraC (Figures 8 et 12).

b) Un alignement de la séquence des acides aminés de la P450 Réductase putative de topinambour avec les P450 Réd d'Arabidopsis montre
5 une conservation particulière dans les domaines fonctionnels auparavant décrits pour les eukaryotes supérieurs à l'exception des plantes (Yabusaki et al, 1988).

c) L'ADNc de la P450 Réd de Topinambour montre une homologie significativement supérieure avec la forme d'AraC (73%) qu'avec
10 la forme AraB (69%), ce qui laisse supposer l'existence de plusieurs gènes indépendants chez le topinambour, contrairement à ce qui a été rapporté dans la littérature pour les P450 Réd de mammifères.

d) Compte tenu de la faible homologie de la P450 Réd de topinambour avec les P450 Réd connues de la littérature, il n'est pas
15 possible d'isoler cet ADNc à l'aide de séquences d'ADNc de P450 Réd déjà connues de la littérature.

20

25

30

35

LEGENDE DES FIGURES

- 5 **FIGURE 6 :** Classes déterminées par la digestion (Bam HI + Hind III)
- FIGURE 7 :** Mesure des activités NADPH Cyt P450 Réductase des 4
10 clones sélectionnés selon leur résistance au kétoconazole.
- FIGURE 8 :** Homologie entre NADPH-P450 Réductases végétales et
 comparaison à des P450 Réductases connues, humaines et
15 de levure.
- FIGURE 9 :** SEQ ID N° 1
- 20 TYPE DE SEQUENCE :
 Nucléotides et acides aminés correspondants
- LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 2114 paires de base
- 25 NOMBRE DE BRINS :
 séquence double brin représentée par un seul brin dans le
 sens 5' - 3' et de gauche à droite.
- CONFIGURATION : linéaire
- 30 TYPE DE MOLECULE : ADN complémentaire
- ORIGINE
- 35 ORGANISME :
 Arabidopsis Thaliana - L. HEYNH (Landsberg erecta)

SOURCE EXPERIMENTALE IMMEDIATE :

jeunes plantules stade deux feuilles

CARACTERISTIQUES :

5

Nucléotides 1-35 : bordure 5' non codante

10

Nucléotides 36-2111 : région codante sur le brin
présenté

Nucléotides 2111-2114 : bordure 3' non codante

PROPRIETES :

15

ADNc codant pour AraB, une NADPH-Cytochrome P450
Réductase

FIGURE 10 : SEQ ID N° 2

20

TYPE DE SEQUENCE :

Nucléotides et acides aminés correspondants

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 2426 paires de base

25

NOMBRES DE BRINS :

séquence double brin représentée par un seul brin dans le
sens 5' - 3' et de gauche à droite

30

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADN complémentaire

35

ORIGINE

ORGANISME :

Arabidopsis Thaliana - L. HEYNH (Landsberg erecta)

SOURCE EXPERIMENTALE IMMEDIATE :

jeunes plantules stade deux feuilles

CARACTERISTIQUES :

Nucléotides 1 - 130 : bordure 5' non codante

Nucléotides 131 - 2266 région codante sur le brin présenté

Nucléotides 2267 - 2426 bordure 3' non codante

PRORIETES :

ADNc codant pour AraC, une NADPH-Cytochrome P450 Réductase

FIGURE 11 : SEQ ID N° 3

TYPE DE SEQUENCE :

Nucléotides et les acides aminés correspondants

LONGUEUR DE LA SEQUENCE : 2112 paires de base

NOMBRE DE BRINS :

séquence double brin représentée par un seul brin dans le sens 5' - 3' et de gauche à droite

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADN complémentaire

ORIGINEORGANISME :

Helianthus Tuberosus L. variété blanc commun

5

CARACTERISTIQUES :

Nucléotides 1 - 2112 : région codante comprenant la
région carboxy terminale entière mais incomplète en la
région amino terminale

10

PROPRIETES :

ADNc codant pour TopA, une NADPH-Cytochrome P450
Réductase

15

20

25

30

35

LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

- 1) Ortiz de Montellano, P.R. (ed.) 1986 Cytochrome P450 : Structure, Mechanism and Biochemistry, Plenum Press, New York
- 5 2) Guengerich, F.P. et Macdonald, T.L. (1990) FASEB J. 4 : 2453-2459
- 3) Durst, F. 1991 Frontiers in Biotransformation (Ruckpaul, K and Rein, H., eds), Volume 4, 191-232, Akademie Verlag, Berlin
- 4) Zimmerlin, A. et Durst, F. 1990 Phytochemistry, 29, 1729-1732
- 5) Fonné-Pfister, R. et Kreuz, K. 1990 Phytochemistry, 29, 2793-2797
- 10 6) Petersen, M. et Seitz, H.U. 1985 FEBS Lett., 188, 11-14
- 7) Ernster, L., Lind, C., Nordenbrand, K., Thor, H., et Orrenius, S. dans Oxygen Metabolism and Oxygen Metabolism (Nozaki, M., Yamamoto, S., Ishimura, Y., Coon, M. Ernster, L., and Eastabrook, R., eds) pp 357-369, Academic Press, Orlando)
- 15 8) Fujita, M. et Ashai, T. 1985 Plant Cell. Physiol. 26, pp 397-405
- 9) Benveniste, I., Gabriac, B. et Durst, F. 1986 Biochem. J. 235, pp 365-373
- 10 Benveniste, I. Lesot, A., Hasenfratz, M.P. et Durst, F. 1989 Biochem. j. 259, pp 847-853
- 11 Benveniste, I., Lesot, A., Hasenfratz, M.P., Kochs, G. et Durst, F. 1991
- 20 Biochem. Biophys. Res. Comm.
- 12) Lesot, A., Benveniste, I., Hasenfratz, M.P. et Durst, F. 1990, Plant Cell Physiol. 31, 1177-1182
- 13) Sutter, T.R. and Loper, J.C. 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160, pp 1257-1266
- 25 14) Yoshida, Y. et Aoyama, Y., 1991 Frontiers in Biotransformation (Ruckpaul, K. and Rein, H., eds) Vol 4, pp 127-148
- 15) Vanden Bossche, H., 1985 Current Topics in Medical Mycology (McGinnis, M.R., ed), Vol 1, pp 313-351
- 16) Mellor, J., Dobson, M.J., Roberts, N.A., Kingsman, A.J., et Kingsman, S.M. 1985, Gene 33, pp 215-266
- 30 17) Minet, M. et Lacroute, F. 1990, Curr. Genet. 18, pp 287-291
- 18) Aruffo, A. et Seed, B. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, pp 8573-8577
- 19) Moore, C.L. et Sharp, P.A. 1984, Cell 36, pp 581-591
- 20) Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A.R. 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
- 35 74, 5463-5467

- 21) Yabusaki, Y., Murakami, H. et Ohkawa, H. 1988 J. Biochem. 103, pp 1004-1010
- 22) Yamano, S., Aoyama, T., McBride, O.W., Hardwick, J.P. Gelboin, H.V. and Gonzales, F.J. 1989, Mol. Pharmacol. 35, pp 83-88
- 5 23) Okayama, H. et Berg, P. 1982, Mol. Cell Biol. 2, pp 161-170
- 24) Haniu, M., Iyanagi, T., Legesse, K., et Shively, J.E. 1984 J. Biol. Chem. 259, pp 13703-13711
- 25) Porter, T.D., et Kasper, C.B. 1986 Biochemistry 25, pp 1682-1687
- 26) Porter, C.D. et Kasper, C.B. 19985 Proc. Natl. Acad. Sci.USA 82, pp 973-977
- 10 27) Katagiri, M. Murakami, H., Yabusaki, Y., Sugiyama, T., Okamoo, M., Yanano, T. et Ohkawa, H. 1986, J. Biochemistry 100, pp 945-954
- 28) Vogel, F. et Lumper, L. 1986, Biochem.J. 236, pp 871-878

15

20

25

30

35

REVENDEICATIONS

1. Procédé de clonage d'une séquence d'ADN codant pour une NADPH Cytochrome P450 Réductase d'un organisme, notamment de
5 plantes, caractérisé en ce que :

- 1- On soumet une souche de levure transformée avec des plasmides d'une banque d'ADNc total dudit organisme, notamment de ladite plante, et ayant un phénotype de déficience en activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène, à un traitement
10 avec un inhibiteur de cytochrome P450 à une dose qui rend létale l'absence d'activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène, puis
- 2- On récupère les clones survivants et on en extrait les plasmides permettant l'expression d'une activité NADPH-Cytochrome P450
15 Réductase qui correspond à la NADPH-Cytochrome P450 Réductase dudit organisme, notamment de ladite plante.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le gène de la NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène de levure est
20 mis sous le contrôle d'un promoteur inductible et à l'étape 1, on réalise successivement les sous-étapes suivantes :

- 1-a) On transforme une souche de levure avec des plasmides d'une banque d'ADNc total dudit organisme, notamment de ladite plante, puis
- 25 1-b) On induit la déficience en activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène en inactivant ledit promoteur, et
- 1-c) On soumet ladite souche à un traitement avec ladite dose d'inhibiteur de cytochrome P450.

30 3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que, à l'aide des plasmides récupérés à l'étape 2, on transforme une souche de levure dans laquelle le gène de la NADPH cytochrome P450 Réductase endogène a été délété et on réitère un traitement avec un inhibiteur de
35 cytochrome P450 à une dose qui rend létale l'absence d'activité NADPH

cytochrome P450 endogène, puis on récupère les clones survivants et on en extrait les plasmides permettant l'expression d'une activité NADPH cytochrome P450 qui correspond à la NADPH cytochrome P450 Réductase dudit organisme, notamment de ladite plante.

5

4. Procédé selon la revendication 1 à 3 caractérisé en ce que la souche est une souche de saccharomyces cerevisiae.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que l'inhibiteur d'activité P450 est un inhibiteur de lanostérol 14-déméthylase tel qu'un composéazole antifongique, en particulier le kétoconazole.

6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que l'inhibiteur d'activité P450 tel que le kétoconazole est utilisé à une dose comprise entre 5 et 100 µg/ml de milieu de culture, de préférence entre 10 et 50 µg/ml.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'à l'étape 1 ; la banque d'ADNc est enrichie en NADPH-Cytochrome P450 Réductase d'intérêt, par fractionnement selon la taille, en ne conservant que les fragments de taille supérieure à 2 kpb.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce qu'on clone la séquence d'ADNc codant pour une NADPH Cytochrome P450 Réductase d'Arabidopsis à partir d'une banque d'ANDc totale ou enrichie de ladite plante.

9. Procédé de clonage d'un gène de NADPH Cytochrome P450 Réductase de plante par hybridation sous condition de faible stringence avec un ADNc d'une NADPH Cytochrome P450 d'une autre plante obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à 8 à partir d'une banque d'ADNc total ou ou enrichie en fragments supérieurs à 2 kbp de ladite plante.

10. Séquences d'ADNc codant pour une NADPH Cytochrome P450 Réductase de plante obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

11. Séquences d'ADNc codant pour des NADPH Cytochrome P450 Réductase d'arabidopsis ara-B ou ara-C, ou de topinambour heliantus tuberosus, telles que représentées aux Figures 9 à 11 respectivement.

5

12. Séquences d'ADN codant pour des NADPH Cytochrome P450 Réductase de plantes s'hybridant dans des conditions faiblement stringentes à 50°C et/ou présentant au moins 60% d'homologie avec l'une des séquences selon les revendications 10 ou 11.

— 10

13. Protéine NADPH-cytochrome P450 Réductase de plante obtenue par l'expression dans la levure d'un gène de NADPH-Cytochrome P450 Réductase constitué par une séquence codante d'ADN selon l'une des revendications 10 à 12.

15

20

25

30

35

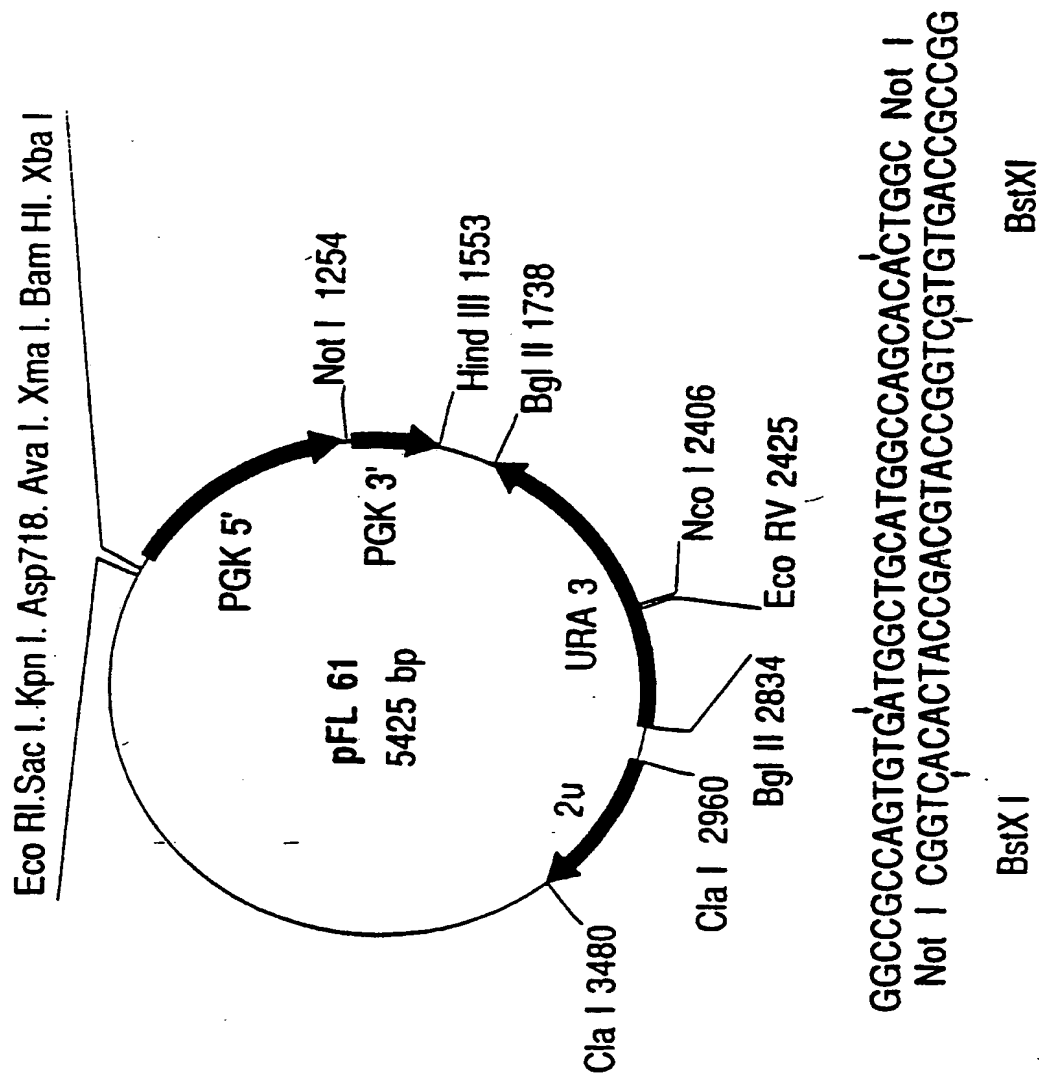


FIGURE 1

[illegible]

TCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTACAAACAATAATAAAACCGCGCCAGTGGA 120
 AGTTCCCTTCATTAAATAGATGAAAAATGTTGTTATATTTTGTGTCGCCGGCGGTACACACT

FIGURE 2/1

3/40

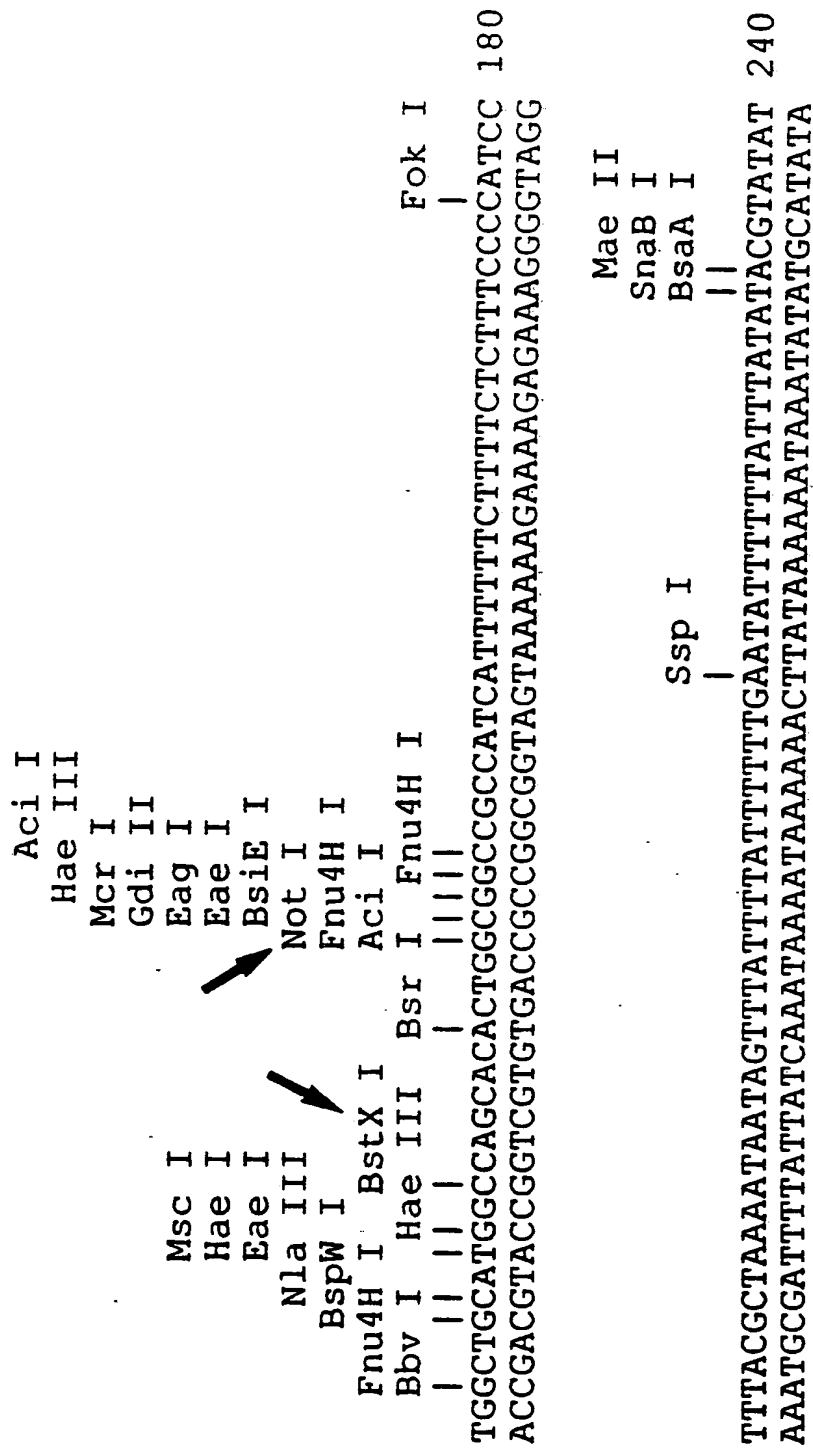


FIGURE 2/2

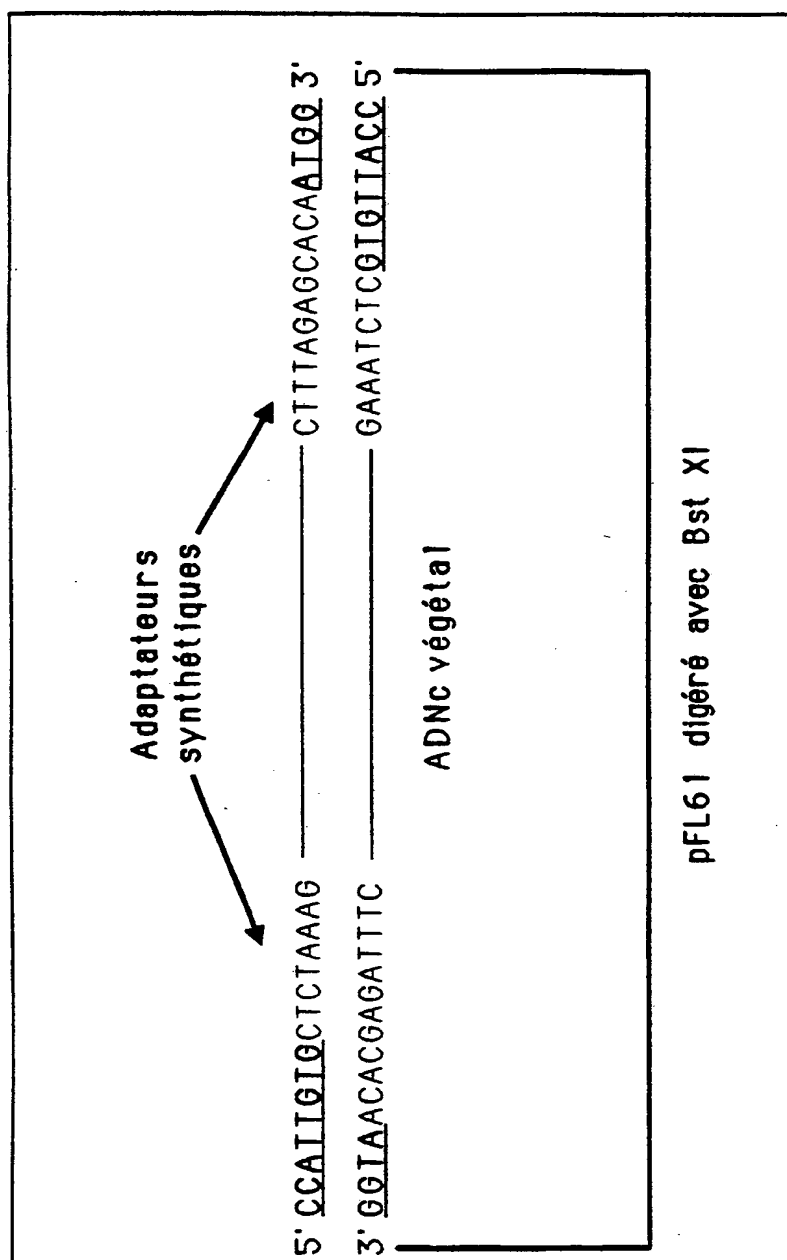


FIG.3

5/40

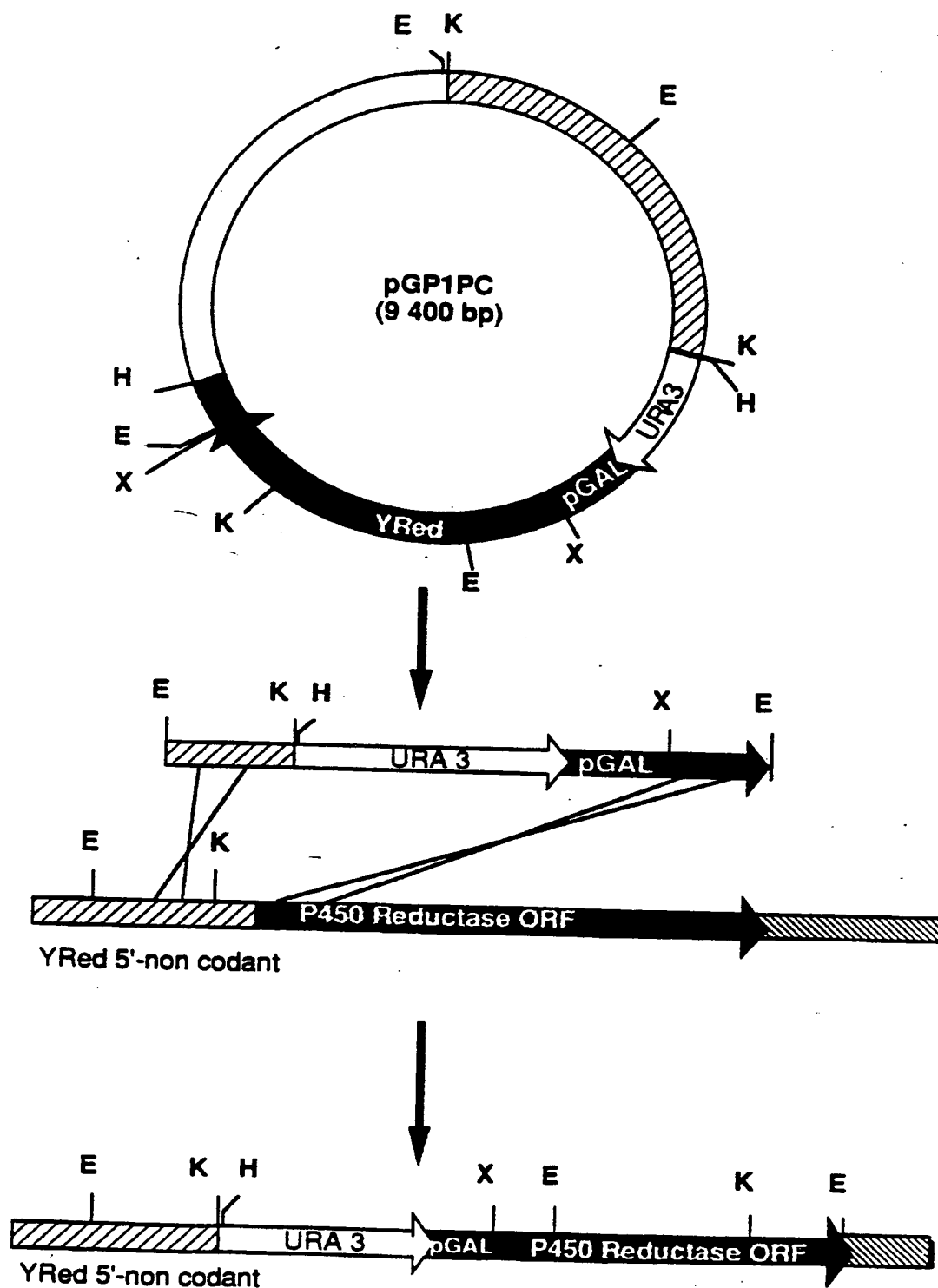


FIGURE 4

6/40

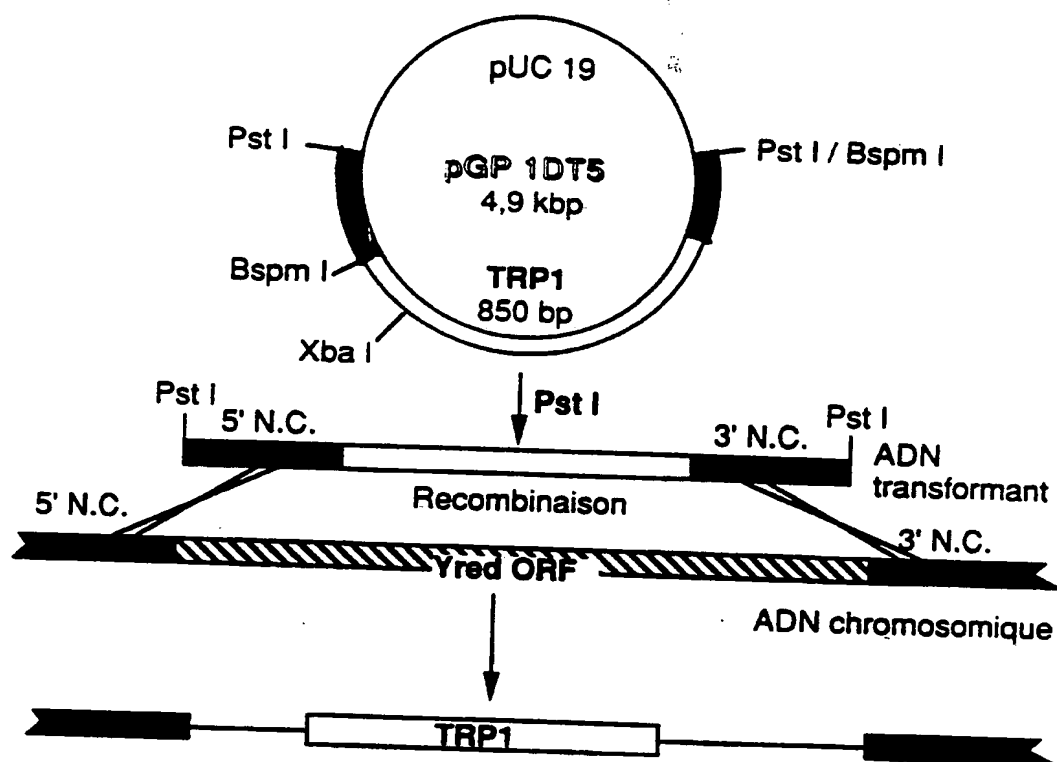


FIGURE 5

	A	B	C	D	E	pFL61
Taille (kb) des bandes obtenues	4,4 2,0 1,2 1,0	4,4 2,0 1,2	4,4 2,0 1,7	4,4 2,0 1,05	4,4 2,5 1,2	4,4 1,15
Taille de l'insert (kb)	3,05	2,05	2,55	1,9	2,55	
Nombre de clones sur 24 étudiés	7 (pool 2)	6 (pool 1)	5 (pool 1)	1 (pool 2)	1(pool 1) 4(pool 2)	

FIG. 6

SOUCHES	S.cere- visae WRΔ "Vide"	A / WRΔ	B/ WRΔ	C / WRΔ	E / WRΔ	S.Cere- visae sauvage
Activité Spécifique nmole/mIn /mg	4,6	145	13	113	187	53

FIG .7

	Réd 1	x	Réd 2	Identité en ac. am.	Biels 3ème base ac. am. Identique
1	Ara B		Ara C	64%	3,8%
2	Hred		Ara B	36%	0,1%
3	Hred		Ara C	36%	2,5%
4	Yred		Ara B	30%	0,9%
5	Hred		Yred	33%	3,3%
6	Ara B		Top A	69%	4,3%
7	Ara C		Top A	73%	9,6%
8	H1A1		H1A2	72%	24%
9	H1A1		M1A1	80%	25%

FIG. 8

SEQUENCE ID N° 1

CCCTGGAGAG AGAGAGAGAG TGACGGGGGA AGAAG ATG ACT TCT GCT TTG TAT 53
Met Thr Ser Ala Leu Tyr
1 5

GCT TCC GAT TTG TTT AAG CAG CTC AAG TCA ATT ATG GGG ACA GAT TCG 101
Ala Ser Asp Leu Phe Lys Gln Leu Lys Ser Ile Met Gly Thr Asp Ser
10 15 20

TTA TCC GAC GAT GTT GTA CTT GTG ATT GCA ACG ACG TCT TTG GCA CTA 149
Leu Ser Asp Asp Val Val Leu Val Ile Ala Thr Thr Ser Leu Ala Leu
25 30 35

GTA GCT GGA TTT GTG GTG TTG TTA TGG AAG AAA ACG ACG GCG GAT CGG 197
Val Ala Gly Phe Val Val Leu Leu Trp Lys Lys Thr Thr Ala Asp Lys
40 45 50

AGC GGG GAG CTG AAG CCT TTG ATG ATC CCT AAG TCT CTT ATG GCT AAG 245
Ser Gly Glu Leu Lys Pro Leu Met Ile Pro Lys Ser Leu Met Ala Lys
55 60 65 70

10/40

FIGURE 9/1

11/40

GAC GAG GAT GAT TTG GAT TTG GGA TCC GGG AAG ACT AGA GTC TCT 293
 Asp Glu Asp Asp Asp Leu Asp Leu Gly Ser Gly Lys Thr Lys Val Ser
 75 80 85

ATC TTC TTC GGT ACG CAG ACT GGA ACA GCT GAG GGA TTT GCT AAG GCA 341
 Ile Phe Phe Gly Thr Gln Thr Gly Thr Ala Glu Gly Phe Ala Lys Ala
 90 95 100

TTA TCC GAA GAA ATC AAA GCG AGA TAT GAA AAA GCA GCA GTC AAA GTC 389
 Leu Ser Glu Glu Ile Lys Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Ala Val Lys Val
 105 110 115

ATT GAC TTG GAT GAC TAT GCT GCC GAT GAT GAC CAG TAT GAA GAG AAA 437
 Ile Asp Leu Asp Asp Tyr Ala Ala Asp Asp Asp Gln Tyr Glu Glu Lys
 120 125 130

TTG AAG AAG GAA ACT TTG GCA TTT TTC TGT GGT GCT ACT TAT GGA GAT 485
 Leu Lys Lys Glu Thr Leu Ala Phe Phe Cys Val Ala Thr Tyr Gly Asp
 135 140 145 150

FIGURE 9/2

12/40

GGA GAG CCT ACT GAC AAT GCT GCC AGA TTT TCA AAA TGG TTT ACG GAG 533
 Gly Glu Pro Thr Asp Asn Ala Ala Lys Phe Ser Lys Trp Phe Thr Glu
 155 160 165

GAA AAT GAA CGG GAT ATA AAG CTT CAA CAA CTA GCA TAT GGT GTG TTT 581
 Glu Asn Glu Lys Asp Ile Lys Leu Gln Gln Leu Ala Tyr Gly Val Phe
 170 175 180

GCT CTT GGT AAT CGC CAA TAT GAA CAT TTT AAT AAG ATC GGG ATA GTT 629
 Ala Leu Gly Asn Lys Gln Tyr Glu His Phe Asn Lys Ile Gly Ile Val
 185 190 195

CTT GAT GAA GAG TTA TGT AAG AAA GGT GCA AAG CGT CTT ATT GAA GTC 677
 Leu Asp Glu Glu Leu Cys Lys Lys Gly Ala Lys Lys Leu Ile Glu Val
 200 205 210

GGT CTA GGA GAT GAT GAT CAG AGC ATT GAG GAT GAT TTT AAT GCC TGG 725
 Gly Leu Gly Asp Asp Asp Gln Ser Ile Glu Asp Asp Phe Asn Ala Trp
 215 220 225 230

FIGURE 9/3

13/40

AAA GAA TCA CTA TGG TCT GAG CTA GAC AAG CTC CTC AAA GAC GAG GAT	773
Lys Glu Ser Leu Trp Ser Glu Leu Asp Lys Leu Lys Asp Glu Asp	245
	240
	235
GAT AAA AGT GTG GCA ACT CCT TAT ACA GCT GTT ATT CCT GAA TAC CGG	821
Asp Lys Ser Val Ala Thr Pro Tyr Thr Ala Val Ile Pro Glu Tyr Lys	260
	255
	250
GTG GTG ACT CAT GAT CCT CGG TTT ACA ACT CAA AAA TCA ATG GAA TCA	869
Val Val Thr His Asp Pro Lys Phe Thr Thr Gln Lys Ser Met Glu Ser	275
	270
	265
AAT GTG GCC AAT GGA AAT ACT ACT ACT ATT GAC ATT CAT CAT CCC TGC AGA	917
Asn Val Ala Asn Gly Asn Thr Thr Thr Ile Asp Ile His His Pro Cys Lys	290
	285
	280
GTT GAT GTT GCT GTG CAG AAG GAG CTT CAC ACA CAT GAA TCT GAT CGG	965
Val Asp Val Ala Val Gln Lys Glu Leu His Thr His Glu Ser Asp Lys	310
	305
	300
	295

FIGURE 9/4

14/40

TCT TGC ATT CAT CTC GAG TTC GAC ATA TCC AGG ACG GGT ATT ACA TAT 1013
 Ser Cys Ile His Leu Glu Phe Asp Ile Ser Lys Thr Gly Ile Thr Tyr 325
 315 320

GAA ACA GGT GAC CAT GTA GGT GTA TAT GCT GAA AAT CAT GTT GAG ATA 1061
 Glu Thr Gly Asp His Val Gly Val Tyr Ala Glu Asn His Val Glu Ile 340
 330 335

GTT GAA GAA GCT GGA AAA TTG CTT GGC CAC TCT TTA GAT TTA GTA TTT 1109
 Val Glu Glu Ala Gly Lys Leu Leu Gly His Ser Leu Asp Leu Val Phe 355
 345 350

TCC ATA CAT GCT GAC AAG GAA GAT GGC TCC CCA TTG GAA AGC GCA GTG 1157
 Ser Ile His Ala Asp Lys Glu Asp Gly Ser Pro Leu Glu Ser Ala Val 360
 365 370

CCG CCT CCT TTC CCT GGT CCA TGC ACA CTT GGG ACT GGT TTG GCA AGA 1205
 Pro Pro Pro Phe Pro Gly Pro Cys Thr Leu Gly Thr Gly Leu Ala Lys 385
 375 380 390

FIGURE 9/5

TAC GCA GAC CTT TTG AAC CCT CCT CGA AAG TCT GCG TTA GTT GCC TTG 1253
 Tyr Ala Asp Leu Leu Asn Pro Pro Lys Lys Ser Ala Leu Val Ala Leu 405
 395 400

GCG GCC TAT GCC ACT GAA CCA AGT GAA GCC GAG AAA CTT AAG CAC CTG 1301
 Ala Ala Tyr Ala Thr Glu Pro Ser Glu Ala Glu Lys Leu Lys His Leu 420
 410 415

ACA TCA CCT GAT GGA AAG GAT GAG TAC TCA CAA TGG ATT GTT GCA AGT 1349
 Thr Ser Pro Asp Gly Lys Asp Glu Tyr Ser Gln Trp Ile Val Ala Ser 435
 425 430

CAG AGA AGT CTT TTA GAG GTG ATG GCT GCT TTT CCA TCT GCA AAA CCC 1397
 Gln Lys Ser Leu Leu Glu Val Met Ala Ala Phe Pro Ser Ala Lys Pro 450
 440 445

CCA CTA GGT GTA TTT TTT GCT GCA ATA GCT CCT CGT CTA CAA CCT CGT 1445
 Pro Leu Gly Val Phe Phe Ala Ala Ile Ala Pro Lys Leu Gln Pro Lys 470
 455 460 465

FIGURE 9/6

16/40

TAC	TAC	TCC	ATC	TCA	TCC	TGC	CAA	GAT	TGG	GCG	CCA	AGT	AGA	GTT	CAT	1493
Tyr	Tyr	Ser	Ile	Ser	Ser	Cys	Gln	Asp	Trp	Ala	Pro	Ser	Lys	Val	His	
			475						480						485	
GTT	ACA	TCC	GCA	CTA	GTA	TAT	GGT	CCA	ACT	CCT	ACT	GGT	AGA	ATC	CAC	1541
Val	Thr	Ser	Ala	Leu	Val	Tyr	Gly	Pro	Thr	Pro	Thr	Gly	Lys	Ile	His	
			490					495						500		
AAG	GGT	GTG	TGT	TCT	ACG	TGG	ATG	AAG	AAT	GCA	GTT	CCT	GCG	GAG	AAA	1589
Lys	Gly	Val	Cys	Ser	Thr	Trp	Met	Lys	Asn	Ala	Val	Pro	Ala	Glu	Lys	
			505				510							515		
AGT	CAT	GAA	TGT	AGT	GGA	GCC	CCA	ATC	TTT	ATT	CGA	GCA	TCT	AAT	TTC	1637
Ser	His	Glu	Cys	Ser	Gly	Ala	Pro	Ile	Phe	Ile	Lys	Ala	Ser	Asn	Phe	
			520				525						530			
AAG	TTA	CCA	TCC	AAC	CCT	TCA	ACT	CCA	ATC	GTT	ATG	GTG	GGA	CCT	GGG	1685
Lys	Leu	Pro	Ser	Asn	Pro	Ser	Thr	Pro	Ile	Val	Met	Val	Gly	Pro	Gly	
			535				540						545		550	

FIGURE 9/7

17/40

ACT GGG CTG GCA CCT TTT AGA GGT TTT CTG CAG GAA AGG ATG GCA CTA	1733
Thr Gly Leu Ala Pro Phe Lys Gly Phe Leu Gln Glu Lys Met Ala Leu	565
	555
AAA GAA GAT CGA GAA GAA CTA GGT TCA TCT TTG CTC TTC TTT GGG TGT	1781
Lys Glu Asp Gly Glu Glu Leu Gly Ser Ser Leu Leu Phe Phe Gly Cys	580
	570
	575
AGA AAT CGA CAG ATG GAC TTT ATA TAC GAG GAT GAG CTC AAT AAT TTT	1829
Lys Asn Lys Gln Met Asp Phe Ile Tyr Glu Asp Glu Leu Asn Asn Phe	595
	585
	590
GTT GAT CAA GGC GTA ATA TCT GAG CTC ATC ATG GCA TTC TCC CGT GAA	1877
Val Asp Gln Gly Val Ile Ser Glu Leu Ile Met Ala Phe Ser Lys Glu	610
	600
	605
GGA GCT CAG AAG GAG TAT GTT CAA CAT AAG ATG ATG GAG AAG GCA GCA	1925
Gly Ala Gln Lys Lys Glu Tyr Val Gln His Lys Met Met Glu Lys Ala Ala	630
	615
	620
	625

FIGURE 9/8

18/40

CAA GTT TCG GAT CTA ATA AAG GAA GAA GGA TAT CTC TAT GTA TGC GGT	1973
Gln Val Trp Asp Leu Ile Lys Glu Glu Gly Tyr Leu Tyr Val Cys Gly	645
	635
GAT GCT AAG GGC ATG GCG AGG GAC GTC CAC CGA ACT CTA CAC ACC ATT	2021
Asp Ala Lys Gly Met Ala Lys Asp Val His Lys Thr Leu His Thr Ile	660
	655
GTT CAG GAG CAG GAA GGT GTG AGT TCG TCA GAG GCA GAG GCT ATA GTT	2069
Val Gln Glu Gln Glu Gly Val Ser Ser Ser Glu Ala Glu Ala Ile Val	675
	670
AAG AAA CTT CAA ACC GAA GGA AGA TAC CTC AGA GAT GTC TGG TGA	2114
Lys Lys Leu Gln Thr Glu Glu Gly Lys Tyr Leu Lys Asp Val Trp	690
	685
	680

FIGURE 9/9

SEQUENCE ID N° 2

GTGAGTAATT TAGCTCTCTC TCACCTACAC CACACCTAAC CAAACCCCTT ACGATTTCACA 60
 CAGAGAGAGA TCTTCTTCTT CCTTCTTCTT CCTTCTTCTT TCTTCTTCTA GCTACAACAT 120
 CTACAACGCC ATG TCC TCT TCT TCT TCT TCG TCA ACC TCC ATG ATC GAT 169
 Met Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Met Ile Asp
 1 5 10
 CTC ATG GCA GCA ATC ATC AAA GGA GAG CCT GTA ATT GTC TCC GAC CCA 217
 Leu Met Ala Ala Ile Ile Lys Gly Glu Pro Val Ile Val Ser Asp Pro
 15 20 25
 GCT AAT GCC TCC GCT TAC GAG TCC GAG TCC GTA GCT GCT GAA TTA TCC TCT ATG 265
 Ala Asn Ala Ser Ala Tyr Glu Ser Val Ala Ala Glu Leu Ser Ser Met
 30 35 40 45
 CTT ATA GAG AAT CGT CAA TTC GCC ATG ATT GTT ACC ACT TCC ATT GCT 313
 Leu Ile Glu Asn Lys Gln Phe Ala Met Ile Val Thr Thr Ser Ile Ala
 50 55 60

19/40

FIGURE 10/I

20/40

GTT CTT ATT GGT TGC ATC GTT ATG CTC GTT TGG AGG AGA TCC GGT TCT	361
Val Leu Ile Gly Cys Ile Val Met Leu Val Trp Lys Lys Ser Gly Ser	75
	65
	70
GGG AAT TCA AAA CGT GTC GAG CCT CTT AAG CCT TTG GTT ATT AAG CCT	409
Gly Asn Ser Lys Lys Val Glu Pro Leu Lys Pro Leu Val Ile Lys Pro	90
	80
	85
CGT GAG GAA GAG ATT GAT GAT GGG CGT AAG AAA GTT ACC ATC TTT TTC	457
Lys Glu Glu Glu Ile Asp Asp Gly Lys Lys Lys Val Thr Ile Phe Phe	105
	95
	100
GGT ACA CAA ACT GGT ACT GCT GAA GGT TTT GCA AAG GCT TTA GGA GAA	505
Gly Thr Gln Thr Gly Thr Ala Glu Glu Phe Ala Lys Ala Leu Gly Glu	125
	110
	115
	120
GAA GCT AAA GCA AGA TAT GAA AAG ACC AGA TTC AAA ATC GTT GAT TTG	553
Glu Ala Lys Ala Lys Tyr Glu Lys Thr Lys Phe Lys Ile Val Asp Leu	140
	130
	135

FIGURE 10/2

21/40

GAT GAT TAC GCG GCT GAT GAT GAT GAG TAT GAG GAG AAA TTG AAG AAA	601
Asp Asp Tyr Ala Ala Asp Asp Asp Glu Tyr Glu Glu Lys Leu Lys Lys	155
	150
	145
GAG GAT GTG GCT TTC TTC TTC TTA GCC ACA TAT GGA GAT GGT GAG CCT	649
Glu Asp Val Ala Phe Phe Phe Leu Ala Thr Tyr Gly Asp Gly Glu Pro	170
	165
	160
ACC GAC AAT GCA GCG AGA TTC TAC AAA TGG TTC ACC GAG GGG AAT GAC	697
Thr Asp Asn Ala Ala Lys Phe Tyr Lys Trp Phe Thr Glu Gly Asn Asp	185
	180
	175
AGA GGA GAA TGG CTT AAG AAC TTG AAG TAT GGA GTG TTT GGA TTA GGA	745
Lys Gly Glu Trp Leu Lys Asn Leu Lys Tyr Gly Val Phe Gly Leu Gly	200
	195
	190
AAC AGA CAA TAT GAG CAT TTT AAT AAG GTT GCC AAA GTT GTA GAT GAC	793
Asn Lys Gln Tyr Glu His Phe Asn Lys Val Ala Lys Val Val Asp Asp	220
	215
	210

FIGURE 10/3

22/40

ATT CTT GTC GAA CAA GGT GCA CAG CGT CTT GTA CAA GTT GGT CTT GGA	841
Ile Leu Val Glu Gln Gly Ala Gln Lys Leu Val Gln Val Gly Leu Gly	235
	230
	225
GAT GAT GAC CAG TGT ATT GAA GAT GAC TTT ACC GCT TGG CGA GAA GCA	889
Asp Asp Asp Gln Cys Ile Glu Asp Asp Phe Thr Ala Trp Lys Glu Ala	240
	245
	250
TTG TGG CCC GAG CTT GAT ACA ATA CTG AGG GAA GAA GGG GAT ACA GCT	937
Leu Trp Pro Glu Leu Asp Thr Ile Leu Lys Glu Glu Gly Asp Thr Ala	255
	260
	265
GTT GCC ACA CCA TAC ACT GCA GCT GTG TTA GAA TAC AGA GTT TCT ATT	985
Val Ala Thr Pro Tyr Thr Ala Ala Val Leu Glu Tyr Lys Val Ser Ile	270
	275
	280
	285
CAC GAC TCT GAA GAT GCC AAA TTC AAT GAT ATA ACA TTG GCA AAT GGG	1033
His Asp Ser Glu Asp Ala Lys Phe Asn Asp Ile Thr Leu Ala Asn Gly	290
	295
	300

FIGURE 10/4

23/40

AAT GGT TAC ACT GTG TTT GAT GCT CAA CAT CCT TAC AAA GCA AAT GTC	1081
Asn Gly Tyr Thr Val Phe Asp Ala Gln His Pro Tyr Lys Ala Asn Val	315
	310
	305
GCT GTT AAA AGG GAG CTT CAT ACT CCC GAG TCT GAT CGT TCT TGT ATC	1129
Ala Val Lys Lys Glu Leu His Thr Pro Glu Ser Asp Lys Ser Cys Ile	330
	325
	320
CAT TTG GAA TTT GAC ATT GCT GGA AGT GGA CTT ACG ATG AAA CTT GGA	1177
His Leu Glu Phe Asp Ile Ala Gly Ser Gly Leu Thr Met Lys Leu Gly	345
	340
	335
GAT CAT GTT GGT GTA CTT TGT GAT AAC TTA AGT GAA ACT GTA GAT GAA	1225
Asp His Val Gly Val Leu Cys Asp Asn Leu Ser Glu Thr Val Asp Glu	365
	355
	350
GCT CTT AGA TTG CTG GAT ATG TCA CCT GAT ACT TAT TTC TCA CTT CAC	1273
Ala Leu Lys Leu Leu Asp Met Ser Pro Asp Thr Tyr Phe Ser Leu His	380
	375
	370

FIGURE 10/5

24/40

GCT GAA AAA GAA GAC GGC ACA CCA ATC AGC AGC TCA CTG CCT CCT CCC 1321
 Ala Glu Lys Glu Asp Gly Thr Pro Ile Ser Ser Ser Leu Pro Pro Pro 395
 385

TTC CCA CCT TGC AAC TTG AGA ACA GCG CTT ACA CGA TAT GCA TGT CTT 1369
 Phe Pro Pro Cys Asn Leu Lys Thr Ala Leu Thr Lys Tyr Ala Cys Leu 410
 400

TTG AGT TCT CCA AAG AAG TCT GCT TTA GTT GCG TTG GCT GCT CAT GCA 1417
 Leu Ser Ser Pro Lys Lys Ser Ala Leu Val Ala Leu Ala Ala His Ala 425
 415

TCT GAT CCT ACC GAA GCA GAA CGA TTA AAA CAC CTT GCT TCA CCT GCT 1465
 Ser Asp Pro Thr Glu Ala Glu Lys Leu Lys His Leu Ala Ser Pro Ala 440
 430

GGA AAG GAT GAA TAT TCA AAG TGG GTA GTA GAG AGT CAA AGA AGT CTA 1513
 Gly Lys Asp Glu Tyr Ser Lys Trp Val Val Glu Ser Gln Lys Ser Leu 455
 450

FIGURE 10/6

25/40

CTT GAG GTG ATG GCC GAG TTT CCT TCA GCC AAG CCA CCA CTT GGT GTC 1561
 Leu Glu Val Met Ala Glu Phe Pro Ser Ala Lys Pro Pro Leu Gly Val
 465 470 475

 TTC TTC GCT GGA GTT GCT CCA AGG TTG CAG CCT AGG TTC TAT TCG ATA 1609
 Phe Phe Ala Gly Val Ala Pro Lys Leu Gln Pro Lys Phe Tyr Ser Ile
 480 485 490

 TCA TCA TCG CCC AAG ATT GCT GAA ACT AGA ATT CAC GTC ACA TGT GCA 1657
 Ser Ser Ser Pro Lys Ile Ala Glu Thr Lys Ile His Val Thr Cys Ala
 495 500 505

 CTG GTT TAT GAG AAA ATG CCA ACT GCC AGG ATT CAT AAG GCA GTG TGT 1705
 Leu Val Tyr Glu Lys Met Pro Thr Gly Lys Ile His Lys Gly Val Cys
 510 515 520 525

 TCC ACT TGG ATG AAG AAT GCT GTG CCT TAC GAG AAG AGT GAA AAA CTG 1753
 Ser Thr Trp Met Lys Asn Ala Val Pro Tyr Glu Lys Ser Glu Lys Leu
 530 535 540

FIGURE 10/7

26/40

TTC CTC GGG CCG CCG ATA TTT GTT AGG CAA TCC AAC TTC AAG CTT CCT	1801
Phe Leu Gly Lys Pro Ile Phe Val Lys Gln Ser Asn Phe Lys Leu Pro	555
545	550
TCT GAT TCT AAG GTA CCG ATC ATC ATG ATC GGT CCA GGG ACT GGA TTA	1849
Ser Asp Ser Lys Val Pro Ile Ile Met Ile Gly Pro Gly Thr Gly Leu	570
560	565
GCT CCA TTC AGA GGA TTC CTT CAG GAA AGA CTA CCG TTG GTA GAA TCT	1897
Ala Pro Phe Lys Gly Phe Leu Gln Glu Lys Leu Ala Leu Val Glu Ser	585
575	580
GGT GTT GAA CTT GGG CCA TCA GTT TTG TTC TTT GGA TGC AGA AAC CGT	1945
Gly Val Glu Leu Gly Pro Ser Val Leu Phe Phe Gly Cys Lys Asn Lys	605
590	600
AGA ATG GAT TTC ATC TAC GAG GAA GAG CTC CAG CGA TTT GTT GAG AGT	1993
Lys Met Asp Phe Ile Tyr Glu Glu Glu Leu Gln Lys Phe Val Glu Ser	620
610	615

FIGURE 10/8

27/40

GGT GCT CTC GCA GAG CTA AGT GTC GCC TTC TCT CGT GAA GGA CCC ACC	2041
Gly Ala Leu Ala Glu Leu Ser Val Ala Phe Ser Lys Glu Gly Pro Thr	
625	630
	635
AAA GAA TAC GTA CAG CAC AAG ATG ATG GAC AAG GCT TCT GAT ATC TGG	2089
Lys Glu Tyr Val Gln His Lys Met Met Asp Lys Ala Ser Asp Ile Trp	
640	645
	650
AAT ATG ATC TCT CAA GGA GCT TAT TTA TAT GTT TGT GGT CAC GCC AAA	2137
Asn Met Ile Ser Gln Gly Ala Tyr Leu Tyr Val Cys Gly Asp Ala Lys	
655	660
	665
GGC ATG GCA AGA GAT GTT CAC AGA TCT CTC CAC ACA ATA GCT CAA GAA	2185
Gly Met Ala Lys Asp Val His Lys Ser Leu His Thr Ile Ala Gln Glu	
670	675
	680
	685
CAG GGG TCA ATG GAT TCA ACT AAA GCA GAG GGC TTC GTG AAG AAT CTG	2233
Gln Gly Ser Met Asp Ser Thr Lys Ala Glu Gly Phe Val Lys Asn Leu	
690	695
	700

FIGURE 10/9

CAA ACG AGT GGA AGA TAT CTT AGA GAT GTA TGG TAA C GAAACTATTTG 2280
Gln Thr Ser Gly Lys Tyr Leu Lys Asp Val Trp
705 710

AAGCCACACA CTCACTGTGT ACTTATATTTT ATATATATAC GGCACAGAAA TTGCCACATT 2340
ATGATGATCA TTAAGTTTGT GATCGCAAGA AGAAAGGAAC TCCTTTTTTTT TTCCATTTTTT 2400
AATTCTTTT CATATATTTT GAC 2426

28/40

FIGURE 10/10

SEQUENCE ID N° 3

ATG GGA TCG TTG ACG ATG CTT CTG GAC AAT CAG TTG CTG CTG CTG ATG 48
 Met Gly Ser Leu Thr Met Leu Leu Asp Asn Gln Leu Leu Val Leu Met 15
 1 5 10 15

ACG TCA GCA GCG GTT TTG TTA GGT TTT ATA GTA GTT TTC GTG TCG AAT 96
 Thr Ser Ala Ala Val Leu Leu Gly Phe Ile Val Val Phe Val Trp Asn 30
 20 25 30

AGA TCG TCC GGT AAG AAG TCC GGT AAG GAA TTG GAG CCT CCG AAG ATC 144
 Lys Ser Ser Gly Lys Lys Ser Gly Lys Glu Leu Glu Pro Pro Lys Ile 45
 35 40 45

GTC GTG CCG AAG CCG CAG GTG GAG CAG GTT GAT GAC GGT AAG AAG 192
 Val Val Pro Lys Lys Gln Val Glu Gln Glu Val Asp Asp Gly Lys Lys 60
 50 55 60

AAG GTT ACG ATA TTT TTC GGA ACG CAA ACT GGA ACC GCT GAA GGT TTT 240
 Lys Val Thr Ile Phe Phe Gly Thr Gln Thr Gly Thr Ala Glu Gly Phe 80
 65 70 75 80

29/40

FIGURE 11/1

30/40

GCT AAG GCG TTG TTT GAA GAA GCG AAA GCG CGA TAT GAA AAA GCT GTG	288
Ala Lys Ala Leu Phe Glu Glu Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Val	95
	85
TTT AAA GTG GTT GAT TTG GAT TAT GCT GCT GAT GAT GAG GAG TAT	336
Phe Lys Val Val Asp Leu Asp Tyr Ala Ala Asp Glu Glu Tyr	110
	100
GCA GAG AAA TTC AAG AAG GAG ACA TTT GCT TTC TTC GCT ACA	384
Ala Glu Lys Phe Lys Lys Glu Thr Phe Ala Phe Phe Leu Ala Thr	125
	115
TAT GGA GAT GGT GAG CCA ACT GAT AAT GCT GCA AGA TTT TAT AAA TGG	432
Tyr Gly Asp Gly Glu Pro Thr Asp Asn Ala Ala Lys Phe Tyr Lys Trp	140
	130
TTC ACC GAG GGA GAT GAT AAA CGA GTT TGG CTT GAA AAA CTT CAC TAT	480
Phe Thr Glu Gly Asp Asp Lys Gly Val Trp Leu Glu Lys Leu His Tyr	160
	145
	150
	155

FIGURE 11/2

31/40

```

GGT GTG TTT GGT CTT GGC AAC AAA CAG TAT GAG CAT TTC AAC AAG ATT 528
Gly Val Phe Gly Leu Gly Asn Lys Gln Tyr Glu His Phe Asn Lys Ile
165 170 175

GCA TTA GTG GTT GAT GAG GGT CTC ACA GAG CAG GGT GCA AAG CGC TTT 576
Ala Leu Val Val Asp Glu Gly Leu Thr Glu Gln Gly Ala Lys Lys Phe
180 185 190

GTT CCA GTT GGC CTT GGA GAT GAC GAT CAA TCA ATT GAA GAT GAT TTT 624
Val Pro Val Gly Leu Gly Asp Asp Asp Gln Ser Ile Glu Asp Asp Phe
195 200 205

TCT GCA TGG AAA GAA TTA GTG TGG CCT GAA TTG GAT CAA TTG CTT CTT 672
Ser Ala Trp Lys Glu Leu Val Trp Pro Glu Leu Asp Gln Leu Leu Leu
210 215 220

GAT GAA GAC GAC AAG ACT GCT GCC ACT CCT TAC ACA GCT GCC ATT CCC 720
Asp Glu Asp Asp Lys Thr Ala Ala Thr Pro Tyr Thr Ala Ala Ile Pro
225 230 235 240

```

FIGURE 11/3

32/40

GAA TAC CGA GTC GTG TTT CAT GAC AAA CCT GAT ACG TTT TCC GAG AAT	768
Glu Tyr Lys Val Val Phe His Asp Lys Pro Asp Thr Phe Ser Glu Asn	255
	250
245	
CAT AGT CAA ACT AAT GGT CAT ACT GTT CAC GAT GCT CAA CAT CCA TGC	816
His Ser Gln Thr Asn Gly His Thr Val His Asp Ala Gln His Pro Cys	270
	265
260	
AGA TCC AAC GTG GCT GTT AAA GAG CTC CAT ACC CCT GAA TCC GAT	864
Lys Ser Asn Val Ala Val Lys Lys Glu Leu His Thr Pro Glu Ser Asp	285
	280
275	
CGC TCC TGC ACT CAT CTT GAA TTT GAC ATC TCT CAC ACT GGA CTA TCA	912
Lys Ser Cys Thr His Leu Glu Phe Asp Ile Ser His Thr Gly Leu Ser	300
	295
290	
TAC GAA ACT GGG GAT CAC GTC GGT GTC TAC TGT GAA AAC CTA ATT GAA	960
Tyr Glu Thr Gly Asp His Val Gly Val Tyr Cys Glu Asn Leu Ile Glu	320
305	310
	315

FIGURE 11/4

33/40

GTA GTG GAG GAA GCT GAG AAA CTG ATA GGA TTA CCA GCA GAT ACT TAT	1008
Val Val Glu Glu Ala Glu Lys Leu Ile Gly Leu Pro Ala Asp Thr Tyr	335
	330
TTC TCA TTA CAC ATT GAT AAC GAA GAT GGA ACA CCA CTC GGT GGA CCT	1056
Phe Ser Leu His Ile Asp Asn Glu Asp Gly Thr Pro Leu Gly Gly Pro	350
	345
	340
ACA TTG CAG CCT CCT TTC CCT CCC TGC ACT TTA AGA AAA GCA TTG ACC	1104
Thr Leu Gln Pro Pro Phe Pro Pro Cys Thr Leu Lys Lys Ala Leu Thr	365
	360
	355
AAT TAC GCA GAT CTG TTG AGT TCT CCC AAA AAG TCA ACC TTG CTT GCT	1152
Asn Tyr Ala Asp Leu Leu Ser Ser Pro Lys Lys Ser Thr Leu Leu Ala	380
	375
	370
CTA GCT GCG CAT GCT TCT GAT GCC ACT GAA GCT GAT CGA CTA CAA TTT	1200
Leu Ala Ala His Ala Ser Asp Ala Thr Glu Ala Asp Lys Leu Gln Phe	400
	395
	390
	385

FIGURE 11/5

34/40

CTT GCA TCT CGT GAG GGC AAG GAT GAA TAT GCT GAA TGG ATT GTT GCA	1248
Leu Ala Ser Lys Glu Gly Lys Asp Glu Tyr Ala Glu Trp Ile Val Ala	405 410 415
AAC CAA AGA AGC CTT CTT GAG GTC ATG GAA GCT TTT CCG TCA GCT AAA	1296
Asn Gln Lys Ser Leu Leu Glu Val Met Glu Ala Phe Pro Ser Ala Lys	420 425 430
CCT CCG CTC GGG GTT TTC TTT GCA GCT ATT GCC CCG CGT TTG CAG CCT	1344
Pro Pro Leu Gly Val Phe Phe Ala Ala Ile Ala Pro Lys Leu Gln Pro	435 440 445
CGA TAC TAC TCT ATT TCT TCC TCC CCA AAG ATG GTA CCC AAC AGG ATT	1392
Lys Tyr Tyr Ser Ile Ser Ser Ser Pro Lys Met Val Pro Asn Lys Ile	450 455 460
CAT GTT ACG TGT GCA TTA GTT TAT GAG AAG ACT CCT GGA GGT CGT ATC	1440
His Val Thr Cys Ala Leu Val Tyr Glu Lys Thr Pro Gly Gly Lys Ile	465 470 475 480

FIGURE 11/6

35/40

CAC AAA GGA ATA TGC ACC TGG ATG AAG AAT GCT GTG CCT TTG ACC	1488
His Lys Gly Ile Cys Ser Thr Trp Met Lys Asn Ala Val Pro Leu Thr	495
	490
	485
GAA AAT CAA GAT TGC AGC TCG GCA CCC ATT TTT GTT AGA ACA TCG AAC	1536
Glu Asn Gln Asp Cys Ser Ser Ala Pro Ile Phe Val Lys Thr Ser Asn	510
	505
	500
TTC AGA CTT CCA GCT GAC CCT AAA GTC CCG GTT ATC ATG ATT GGC CCT	1584
Phe Lys Leu Pro Ala Asp Pro Lys Val Pro Val Ile Met Ile Gly Pro	525
	520
	515
GGA ACC GGG TTG GCT CCG TTT AGA GGT TTT CTT CAA GAA AGA TTA GCT	1632
Gly Thr Gly Leu Ala Pro Phe Lys Gly Phe Leu Gln Glu Lys Leu Ala	540
	535
	530
CTC AAG GAA TCT GGA ACC GAA CTC GGT CAA TCC ATT TTG TTC TTC GGT	1680
Leu Lys Glu Ser Gly Thr Glu Leu Gly Gln Ser Ile Leu Phe Gly	560
	555
	550
	545

FIGURE 11/7

36/40

TGC AGA AAC CGT AAA GTG GAT TTC ATA TAT GAG AAT GAA CTG AAC AAC	1728
Cys Lys Asn Lys Lys Val Asp Phe Ile Tyr Glu Asn Glu Leu Asn Asn	575
	570
565	
TTT GTT GAA AAT GGC GCG CTT TCC GAG CTT GAC ATG GCT TTC TCT CGC	1776
Phe Val Glu Asn Gly Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Ala Phe Ser Lys	590
	585
580	
GAA GGC GCA TCT AAA GAA TAC GTG CAA CAT AAA ATG AGC CAA AAG GCT	1824
Glu Gly Ala Ser Lys Glu Tyr Val Gln His Lys Met Ser Gln Lys Ala	605
	600
595	
TCG GAT ATA TGG AAC ATG CTT TCT GAG GGA GCA TAC TTA TAC GTG TGT	1872
Ser Asp Ile Trp Asn Met Leu Ser Glu Gly Ala Tyr Leu Tyr Val Cys	620
	615
610	
GGT GAT GCC AAA GGC ATG GCT AAA GAT GTA CAC CGA ACC CTT CAC ACC	1920
Gly Asp Ala Lys Gly Met Ala Lys Asp Val His Lys Thr Leu His Thr	640
	635
625	
	630

FIGURE 11/8

37/40

ATT GTG CAA GAA CAG GGA AAT TTG GAT TCC TCT AAA GCA GAG CTG TAT	1968
Ile Val Gln Glu Gln Gly Asn Leu Asp Ser Ser Lys Ala Glu Leu Tyr	655
	645
GTG AAG AAT CTA CAA ATG TCG GGA AGA TAC CTC CGT GAT GTT TGG TGA	2016
Val Lys Asn Leu Gln Met Ser Gly Lys Tyr Leu Lys Asp Val Trp	670
	660
TCTA TCGAGTAAAA CGGAAATAAA TGTGAGGGGA ATTTATAAAC ACTAGTTTAT	2070
GACAGTATAA TTTTGATCCTT TTACATTCAG TAATTCCAAT TT	2112

FIGURE 11/9

1MTSALYASDLFKQLKSI MGTDLSDDVVLVIATTSL
2 MSSSSSTSMIDLMAAIKGEPIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSI
3GSLTMLLDNQL..LVLMTSA
4***

AI

1 A. LVAGFVLLWKKTADRSGEKPLMIPKSLMAKDEDDDLGSGKTRVSIFFGTQGT
2 AVLIGCIVMLVWRRSGNSKRVEPL..KPLVIKPREED..DGRKKVTIFFGTQGT
3 AVLLGFI VVFNRRSSGKKS G..KELEPPKIVVPKRQVEQ.EVDDGKKKVTIFFGTQGT
4 *

1 AEGFAKALSEEIKARYEKA¹AVKVIDLDDYAADDQYEEK¹KKETLAF¹FCVATYGDGEPTD

2 AEGFAKALGEEAKARYEKTRFKIVDLDDYAADDQYEEK²KKEDVAF²FFLATYGDGEPTD

3 AEGFAKALFEEAKARYEKAVFKVVDLDDYAADDEEYAEK³FFKETTAF³FFLATYGDGEPTD

4 *****

A2

1 NAAFSKWFTEENERDIKLQQLAYGVFALGNRQYEHFNKIGIVLDEELCKGAKRLIEVG
2 NAAFYKWFTEGNDRGEWLKNLKYGVFGLGNRQYEHFNKVAKVVDLILVEQGAQRLVQVG
3 NAAFYKWFTEGDDKGVWLEKLHYGVFGLGNKQYEHFNFKIALVVDEGLTEQGAKRFPVVG
4 ***** *

FIGURE 12/1

6

1 VPAEKSHE . CSGAP IFIRASNEFKLP SNPSTP IVMVPGTGLAPFRGFLQERMALKEGEE
2 VPYEKSEKFLGRP IFVRSNEFKLPDSKVP IIMIGPGTGLAPFRGFLQERLALVESGVE
3 VPLTENQDCS . SAP IFVRTSNFRLPADPKVP VIMIGPGTGLAPFRGFLQERLALKESGTE
4 ** *** * * * * * *

★
1 LGSSLLFFGCRNRQMDFIYEDELNNFVDQGVISELIMAFSREGAQKEYVQHKKMMEKAAQV
2 LGPSVLFFGCRNRRMDFIYEELQRVESGAELAELSVAFSREGPTKEYVQHKKMMDKASDI
3 LGQSILFFGCRNRKVDFIYENELNNFVENGAELSELDMAFSREGASKEYVQHKKMSQKASDI
4 ***..*****..*****.***.*****.*****.***.

1 WDLIKEGYLVCGDAKGMARDVHRTLHTIVQEQGVSSSEAEIVKKLQTEGRYL RDVW
2 WNMISQAYLYVCGDAKGMARDVHRSLHTIAEQGSMDSKAEFVKNLQTSGRYL RDVW
3 WNMLSEAYLYVCGDAKGMARDVHRTLHTIVQEQGNLDSSKAELYVKNLQMSGRYL RDVW
4 * *

FIGURE 12/3